

Aspects biochimiques de la Régénération

Par JEAN BRACHET, Bruxelles¹

1. Introduction

Les données dont on dispose à l'heure actuelle sur la biochimie de l'organisme en voie de régénération sont relativement peu nombreuses; elles n'en sont pas moins fort précieuses, car elles permettent d'établir de fructueuses comparaisons entre le métabolisme du régénérat et celui, beaucoup mieux connu, de l'embryon.

Sans parler des aspects morphologiques et physiologiques du problème de la régénération, qui seront traités dans un des prochains fascicules, nous nous limiterons à l'examen des faits essentiels acquis dans le domaine biochimique. Les questions principales auxquelles nous essaierons de fournir des réponses sont les suivantes:

1^o Que faut-il penser de la théorie de CHILD des gradients axiaux, et, plus particulièrement, des bases chimiques de cette théorie?

2^o Comment le métabolisme du régénérat se caractérise-t-il? Est-il intensifié, quelle est la nature des substances oxydées?

3^o Quelle influence les agents physiques ou chimiques, susceptibles d'altérer le métabolisme, exercent-ils sur la régénération?

4^o La croissance dont la régénération est le siège s'accompagne-t-elle d'une synthèse marquée de protéines et de nucléoprotéides?

Après avoir examiné les réponses qu'on peut fournir, dans l'état actuel de nos connaissances, à ces quatre questions fondamentales, nous esquisserons un rapide parallèle entre la biochimie de l'organisme en régénération et celle de l'œuf en voie de développement.

2. Les gradients axiaux de Child

L'analyse physiologique de la régénération reste dominée par la théorie des gradients axiaux de CHILD; sans discuter ici le fond de cette théorie, nous nous bornerons à l'examen de ses bases biochimiques. Rappelons toutefois que, selon CHILD, les organismes en voie de morphogénèse sont le siège de gradients d'ac-

tivité physiologique; ils se traduiraient surtout par des différences progressives dans l'intensité du métabolisme respiratoire. Ce dernier diminuerait petit à petit dans le sens céphalocaudal; toutefois, l'extrémité postérieure, qui constitue fréquemment une zone de croissance active, présenterait parfois, elle aussi, un métabolisme élevé: le gradient respiratoire aura donc tantôt la forme d'une droite décroissante, tantôt celle d'un U. CHILD admet qu'il peut se trouver à la base des gradients des différences progressives dans la composition chimique de l'organisme ou des altérations dans la configuration des protéines; mais de telles différences retentiraient nécessairement, selon CHILD, sur le métabolisme respiratoire: ce dernier présente l'avantage d'être mesurable quantitativement et c'est donc lui qui a été le plus étudié. Le problème qui se pose revient donc à savoir s'il existe des variations progressives (ou en U) dans l'intensité des oxydations le long de l'axe principal d'un organisme; insistons sur le fait que, selon CHILD, il s'agit uniquement de différences *quantitatives* du métabolisme.

CHILD et ses élèves ont consacré un nombre considérable de publications à la vérification de cette théorie; nous ne pouvons examiner que les principaux d'entre ces travaux et nous renverrons le lecteur qui désirerait plus de détails au livre récent (1941) et important de CHILD¹, où on trouvera une discussion fouillée du problème.

Il est cependant nécessaire de dire quelques mots des méthodes employées par CHILD et son école, car elles ont fait l'objet de nombreuses discussions: dans certains cas, il a été fait usage de la détermination directe de l'oxygène absorbé ou du CO₂ éliminé. Les techniques utilisées étaient respectivement la titration de l'oxygène dissous dans l'eau (méthode de WINKLER) et la mesure du pH de l'eau au moyen d'un indicateur. Ces méthodes sont moins classiques que les techniques manométriques employées par d'autres chercheurs et elles ont été critiquées à diverses reprises (SHEARER, PARKER, J. NEEDHAM); il semble, en effet, qu'elles soient plus sujettes à certaines causes d'erreurs, telles que la libération de mucus ou des liquides intérieurs de l'organisme, que les méthodes manométriques. Mais ces dernières, en raison de l'agitation

¹ Une grande partie de cet article est la reproduction d'un chapitre de notre livre «Embryologie chimique» (MASSON, Paris, et DESOER, Liège); nous tenons à remercier les éditeurs de l'ouvrage qui ont bien voulu marquer leur accord. On y trouvera une bibliographie étendue sur les modifications chimiques dont l'organisme en régénération est le siège.

¹ C. M. CHILD, Patterns and problems of development, Chicago Univ. Press (1941).

imprimée au manomètre, ont aussi leurs inconvénients: les fragments d'organismes risquent plus de s'altérer au cours de l'expérience et la motilité de ces fragments se voit accrue. Il serait certainement désirable qu'une étude comparative des différentes méthodes soit faite par un même chercheur travaillant sur un même matériel.

CHILD a fait remarquer avec raison que la respiration ne peut être mesurée que sur des fragments d'un organisme sectionné: les lésions que provoque ce sectionnement altèrent certainement les échanges gazeux et il est certain que c'est le métabolisme des différentes parties d'un organisme *intact* qui nous intéresse surtout. Il n'existe malheureusement pas de méthode directe pour les déterminer; CHILD a donc dû se rabattre sur une série de méthodes indirectes pour mettre en évidence des gradients d'oxydoréduction dans l'organisme intact: il s'agit surtout de la réduction du permanganate ou de colorants vitaux et de l'oxydation du «Nadi» (mélange d' α -naphthol et de diméthylparaphénylénediamine dont l'oxydation donne du bleu d'indophénol) ou de leucodérivés de colorants vitaux. Ces techniques ont donné de jolis résultats dans les mains de CHILD et de ses élèves, mais leur interprétation est extrêmement délicate: de nombreuses causes d'erreurs (colorations secondaires au niveau de granules basophiles ou de gouttelettes lipidiques, réduction du colorant formé) peuvent fausser les résultats. On ne peut aucunement conclure que la région qui se colore en premier lieu par le Nadi ou celle qui réduit le plus vite le bleu de méthylène est celle qui est le siège des oxydations les plus intenses. Une autre technique, de valeur encore plus discutable, est celle de la «susceptibilité différentielle»: elle consiste à placer les organismes étudiés dans une série de substances toxiques et à rechercher si certains territoires se désintègrent plus vite que d'autres. Notons que les régions les plus sensibles ne sont pas affectées spécifiquement par les inhibiteurs du métabolisme (le cyanure par exemple), mais par les poisons les plus variés.

En somme, on voit que les techniques dont on dispose actuellement, restent peu satisfaisantes: les mesures du métabolisme respiratoire ne sont possibles que sur des fragments dont la respiration risque de se modifier; les autres méthodes indiquent bien l'existence de «différences», mais dont la nature exacte est matière à discussion.

Examinons maintenant quelques-uns des cas étudiés par l'école de CHILD et confrontons les résultats avec ceux obtenus par d'autres chercheurs; nous prendrons pour premier exemple les *gradients de réduction*: on les décèle en colorant vitalement par le bleu de méthylène ou le vert Janus l'organisme étudié et en le plaçant ensuite en anaérobiose. Cette méthode simple a été fort employée par CHILD, qui a constaté que la décoloration commence par l'extrémité anté-

rieure et se propage progressivement vers l'arrière; souvent l'extrémité caudale se caractérise par une seconde zone à pouvoir réducteur accru. La fig. 1, empruntée à un travail de CHILD et RULON, représente le phénomène chez le ver *Tubifex*: on y voit, de façon schématique, les deux gradients opposés.

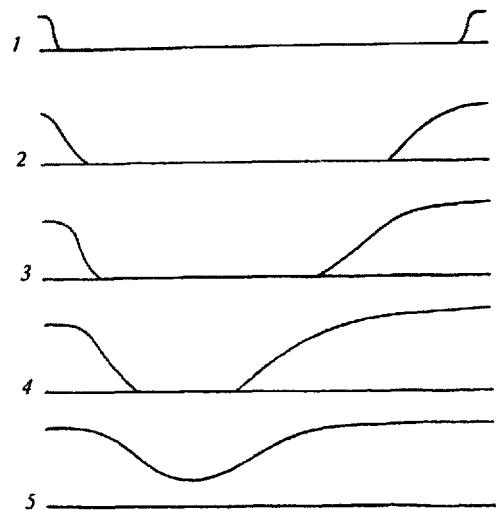


Fig. 1. Gradient de réduction chez *Tubifex*; la vitesse de décoloration est indiquée schématiquement (CHILD et RULON).

Mais les conclusions de CHILD n'ont pas été admises sans réserve: STRELIN n'a pu déceler de gradient de réduction chez un ver proche parent de *Tubifex*, *Limnodrilus*, parce que les différents organes se colorent inégalement; il a échoué aussi dans le cas de *Tubifex*, en raison de la toxicité excessive du bleu

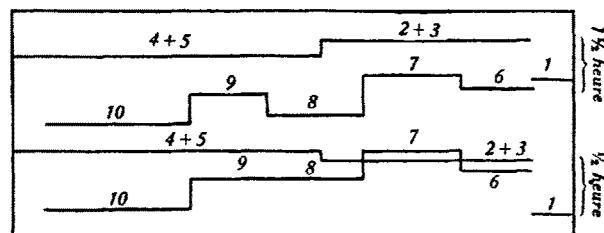


Fig. 2. Gradient de réduction chez la planaire; les chiffres de 1 à 10 correspondent à des segments de plus en plus postérieurs (BRØNDSTED).

de méthylène, qui cause une cytolysé rapide. BRØNDSTED a soigneusement étudié la planaire, un des matériaux favoris de l'école de CHILD: il conclut que les organes fixent des quantités trop variables de bleu de méthylène pour qu'une coloration homogène soit réalisable; on conçoit que les résultats deviennent dès lors d'une interprétation difficile; il semble bien exister un gradient (fig. 2), mais de nature complexe et sans rapport visible avec la fréquence de la régénération des têtes. BRØNDSTED croit que les différences de pouvoir réducteur qu'il a constatées n'ont rien de commun avec l'activité morphogénétique des divers

territoires; elles tiennent plutôt à des variations dans l'intensité métabolique de chaque organe pris individuellement.

Passons maintenant aux mesures directes du métabolisme respiratoire sur des fragments d'animaux.

Une élève de CHILD, HYMAN, a affirmé qu'on peut reconnaître un gradient de métabolisme respiratoire chez divers organismes, notamment les Hydroïdes, les Eponges et les planaires; mais la méthode généralement adoptée (dosage de l'oxygène dissous suivant WINKLER) a été, on l'a vu, l'objet de critiques. Les mesures manométriques de SHEARER n'ont pas montré d'écart dans la consommation d'oxygène à différents niveaux d'embryons de poulet et de vers de terre sectionnés selon l'axe antéropostérieur; les mesures de l'élimination de CO_2 effectuées par PARKER, dans des conditions analogues chez des actinies, *Nereis*, et une planaire ont conduit aux mêmes conclusions. PARKER a d'ailleurs sévèrement critiqué la théorie et les expériences de CHILD: la susceptibilité différentielle tiendrait, selon lui, à la vitesse de pénétration inégale des substances toxiques; elle ne permet aucunement de mettre en évidence le caractère métabolique d'un gradient. PARKER est d'avis que, même si des différences métaboliques suivant un gradient se manifestent, elles ne peuvent être que la conséquence et non la cause de ce gradient. Les critiques que PARKER et SHEARER ont adressées à la théorie de CHILD, ont été également reprises par J. NEEDHAM dans son traité (Chemical Embryology, Cambridge Univ. Press, 1931).

WATANABE et CHILD ont entrepris, en 1933, de réfuter ces objections; ils ont étudié chez un ver polyclade, *Stylochus*, l'élimination de CO_2 (par la méthode colorimétrique de PARKER), la réaction de l'indophénoloxydase et la susceptibilité différentielle. Ils observent d'abord qu'il suffit de sectionner le ver pour que le métabolisme des fragments se modifie profondément: ce n'est qu'une heure après l'opération que les mesures doivent débuter sous peine d'aboutir à des résultats profondément aberrants. Dans de bonnes conditions expérimentales, si on mesure le métabolisme de fragments du ver deux à six heures après le sectionnement, on obtient régulièrement un gradient en U: les deux extrémités, antérieure et postérieure, dégagent plus de CO_2 que la partie moyenne (fig. 3). Les résultats de WATANABE et CHILD sont conformes à ceux qu'avait publiés, peu avant, HYMAN chez *Nereis*.

En outre, WATANABE et CHILD, travaillant sur *Stylochus*, trouvent, dans les larves comme chez les adultes, des gradients dans la répartition de l'indophénoloxydase et dans la susceptibilité différentielle. Ils maintiennent dès lors fermement le point de vue initial de CHILD et répondent, point par point, aux objections faites par SHEARER, PARKER et NEEDHAM. Nous ne pouvons entrer ici dans les détails de cette longue discussion qui ne force pas d'ailleurs la con-

viction; nous croyons que la question restera ouverte tant qu'une série d'obstacles fondamentaux n'aura pas été surmontée: les conséquences de l'opération sur le métabolisme, l'hémorragie qu'elle entraîne, la motilité inégale des fragments antérieur, moyen et postérieur constituent autant de causes d'erreurs sérieuses. On ne pourra décider de l'existence réelle de gradients métaboliques axiaux chez des organismes complexes que le jour où on possédera une technique permettant d'effectuer des mesures sur l'animal intact, placé dans des conditions physiologiques.

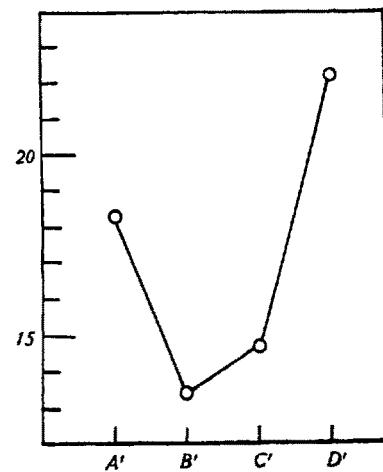


Fig. 3. Gradient de dégagement de CO_2 chez *Stylochus* (WATANABE et CHILD).

Il semble cependant *a priori* qu'on ait peu de chances de déceler un gradient métabolique chez des formes dont les divers segments ne contiennent pas les mêmes organes; certains de ceux-ci ont un métabolisme plus élevé qui doit fatallement influencer les mesures dans la partie de l'individu qui les renferme. C'est pourquoi il serait intéressant de savoir si des différences dans le taux des oxydations s'observent le long d'un même organe, commun à tout l'individu, tel que la peau ou le tube digestif: une tentative utile a été faite dans ce sens par MALUF qui a comparé la consommation d'oxygène de fragments courts, provenant de la paroi du corps, chez le ver de terre; il n'a pas observé de différences dignes d'être relevées, si ce n'est un métabolisme un peu plus bas à l'extrémité antérieure. Les conclusions de MALUF sont donc défavorables à la thèse de CHILD, qui n'est en somme défendue que par les travaux de CHILD lui-même et de ses élèves.

Il est donc très vraisemblable que, chez les vers, il n'y a de gradient métabolique que lorsque l'organisme étudié présente une hétérogénéité graduelle dans sa conformation; dans un ver, chaque organe a son métabolisme propre qui aura sa répercussion sur la respiration du segment où il se trouve logé: c'est d'ailleurs ce qu'a trouvé BRONDSTED, pour le gradient de réduction chez la planaire. L'idée que chez un

organisme aussi complexe qu'un ver, il existe un gradient régulier, apparaît donc comme peu plausible; l'opinion de PARKER, qui voit dans le gradient métabolique un simple épiphénomène, nous semble beaucoup plus admissible que celle de CHILD.

La théorie du gradient métabolique a fait récemment l'objet d'une intéressante vérification de la part de V. BERTALANFFY: il a déterminé avec précision le gradient de croissance chez la planaire et a comparé ses résultats avec ceux de CHILD aux points de vue de la respiration, des oxydoréductions et de la

lotl, deux à quinze jours après l'amputation; il observe une élévation sensible de la glycolyse, puisque la concentration en acide lactique passe de 18 à 39 mg %. Il en résulte d'ailleurs un abaissement du pH dans le blastème, qui descend de 6,95 à 6,71. Des résultats comparables ont été publiés peu après par VLADIMIROVA. Plus récemment, S. WOLSKY a comparé la consommation d'oxygène du blastème de régénération de la queue à celle de cet organe à l'état normal; travaillant sur l'axolotl, il a relevé les chiffres suivants:

Extrémité de la queue normale:

18,3 mm³ d'oxygène / 100 mg de poids frais,
Milieu de la queue normale:

11,1 mm³ d'oxygène / 100 mg de poids frais,
Régénérat:

32,0 mm³ d'oxygène / 100 mg de poids frais.

Les variations observées ont une signification réelle, ainsi que l'a prouvé l'analyse statistique; l'auteur hongrois tend à rapprocher l'élévation du métabolisme dans le blastème de sa teneur accrue en eau (82% au lieu de 75% pour la queue normale). On doit aussi à AJSUPIET des mesures de la consommation d'oxygène chez l'hydre après section: la respiration s'abaisserait pendant la phase de croissance du blastème et dépasserait ensuite la normale au moment où la différenciation s'installe. Il semble bien d'ailleurs que les changements du métabolisme ne se limitent pas au blastème et que la régénération retentisse sur les oxydations de l'organisme entier. Cette constatation ne doit pas nous surprendre, puisque la totalité de l'organisme en régénération est souvent le siège de modifications morphologiques profondes (morphalaxis).

4. Effet des agents extérieurs sur la régénération

On a étudié l'action de nombreux agents chimiques et physiques sur la régénération; nous nous limiterons aux cas les plus importants, parmi lesquels nous citerons en premier lieu le rôle de l'oxygène dans la régénération des Hydroïdes; les expériences déjà anciennes de MORGAN, montrant la nécessité de l'oxygène dans la régénération chez ces organismes, ont été reprises sur une base quantitative par BARTH: il a précisé que la régénération s'arrête lorsque la tension partielle d'O₂ s'abaisse à 0,3%; à ce moment, la respiration de l'organisme est réduite à 29% de la normale. Une élévation de la teneur en oxygène du milieu favorise au contraire la régénération: la partie manquante se reforme plus vite et acquiert de plus grandes dimensions, tandis que la consommation d'oxygène s'accroît (BARTH 1940, 1944; SPIEGELMAN et GOLDIN). L'abaissement de la tension partielle d'oxygène provoque une diminution des dimensions du régénérat, même lorsqu'on opère sur des stades tardifs de la régénération.

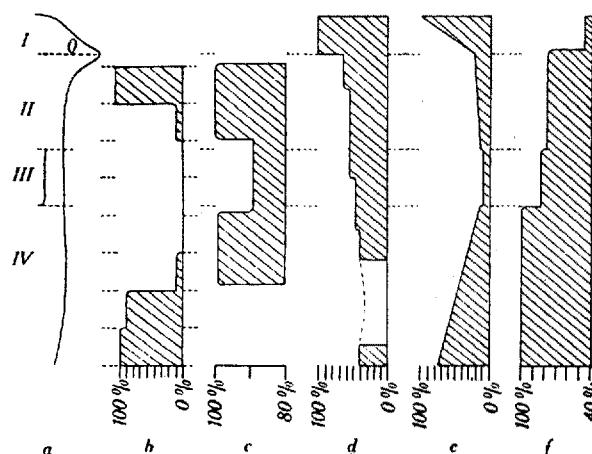


Fig. 4. Comparaison des divers gradients chez la planaire: a schéma des différentes régions chez l'animal; b gradient de la fréquence des têtes; c gradient de la consommation d'oxygène; d gradient de susceptibilité à H₂O; e gradient de susceptibilité à l'alcool; f gradient de croissance (v. BERTALANFFY).

susceptibilité différentielle; comme le montre la figure 4, aucun de ces gradients ne se superpose exactement aux autres; il n'y a en tout cas aucune ressemblance entre les gradients de métabolisme et de croissance. Il faut en déduire que la planaire ne peut présenter un gradient axial unique et qu'il y coexiste sans doute un faisceau de gradients parallèles; il nous semble que cette conclusion rend bien compte des faits connus actuellement et qu'elle peut être acceptée par CHILD: WATANABE et CHILD admettent en effet (*Physiological Zoology*, 6, 575 [1933]) qu'il pourrait exister des gradients parallèles et que tous les agents toxiques qu'ils ont étudiés n'influencent pas nécessairement un seul et même gradient.

3. Métabolisme du régénérat

Jusqu'à présent, nous ne nous sommes occupés que du métabolisme régional dans l'organisme intact; que sait-on des changements chimiques dont le régénérat est le siège?

Les données dont on dispose, en ce qui concerne la *respiration* et la *glycolyse*, sont malheureusement peu nombreuses: OKUNEFF (1933) a dosé la teneur en acide lactique d'un bourgeon de membre chez l'axo-

De curieuses expériences dues à J.-A. MILLER font ressortir encore le rôle important de l'oxygène lors de la régénération: il a placé des tiges de l'hydroïde *Tubularia* dans une chambre spéciale divisée en deux compartiments; la tension d'oxygène de chaque côté de la cloison pouvait être modifiée à volonté. En plongeant l'extrémité proximale dans de l'eau de mer bien aérée et la partie distale dans une eau pauvre en oxygène, MILLER a observé un *renversement de la polarité*; cet effet s'obtient également au moyen d'un gradient thermique. MILLER en conclut que tout changement du métabolisme respiratoire affecte la régénération de l'hydranthe: on sait, en effet, que la consommation d'oxygène des tiges de *Tubularia* présente un gradient décroissant dans le sens disto-proximal (HYMAN, LUND, BARTH); si on renverse ce gradient, en faisant varier la température ou la tension d'oxygène aux deux extrémités de la tige, on obtient un renversement de la morphogénèse. Il y a donc un parallélisme étroit entre la consommation d'oxygène et l'aptitude à la régénération aux divers points de la tige: une telle constatation apporte évidemment un argument de poids à la théorie de CHILD. Notons encore que, selon DEORTTO, la régénération de la partie manquante chez les Hydroïdes est accélérée par des substances élevant en général les oxydations, telles la pyocyanine et la thionine. Ce résultat est en parfaite harmonie avec ceux d'autres auteurs; le cyanure, qui inhibe la respiration, ralentit la régénération chez la planaire (BASSINA, FINKELSTEIN et KOVARSKAJA, RULON); inversement, le dinitrophénol (FINKELSTEIN et KOVARSKAJA) et le bleu de méthylène (RULON) élèvent les oxydations et accélèrent la régénération.

Toutes ces expériences forment un ensemble cohérent et il est désormais hors de doute que le maintien de la respiration à un taux suffisant est un facteur important lors de la régénération. Il serait cependant prématûr de penser que les oxydations constituent le seul facteur responsable de la morphogénèse après sectionnement. Des expériences récentes de GOLDIN et de GOLDIN et BARTH prouvent en effet que l'oxygène n'est pas une «substance formative» spécifique de l'hydranthe, mais simplement l'une des conditions nécessaires à la régénération. Des modifications du pH par exemple pourront influencer aussi la polarité; une acidification du milieu (pH 6,8 au lieu de 8) par exemple, suffit à bloquer la régénération; mais cette acidification provoque une chute de la consommation d'oxygène (SPIEGELMAN et GOLDIN), parallèle à l'inhibition de la régénération. L'acidité paralyse, de manière non spécifique, les systèmes d'oxydation avec, comme corollaire, un arrêt de la régénération.

Signalons enfin que MOOG et SPIEGELMAN ont étudié récemment l'influence d'une série de poisons du métabolisme sur la consommation d'oxygène et la régénération chez *Tubularia*: il s'agissait du cyanure

et de l'azoture de Na (N_3Na) qui touchent surtout la cytochromoxydase et de narcotiques (uréthanes) qui affectent davantage les déshydrases. Tous ces agents arrêtent ou ralentissent la régénération, mais il n'existe pas de rapport direct entre cet effet et l'inhibition des oxydations: c'est ainsi que N_3Na et les uréthanes inhibent déjà la régénération à des doses où ils n'ont qu'un effet léger sur la respiration. Il faut en conclure que la régénération n'exige qu'une partie minime de l'énergie fournie par les oxydations et que certains systèmes respiratoires, sensibles à N_3Na et aux narcotiques, sont particulièrement importants.

Parmi les auteurs qui ont cherché à influencer la régénération par l'addition de diverses substances, mentionnons particulièrement BRØNDSTED qui eut l'heureuse idée d'éprouver le chlorure de lithium: on sait en effet que l'ion Li^+ exerce des effets profonds sur la morphogénèse chez l'oursin et les Amphibiens. Chez la planaire, LiCl est sans action aucune sur la fréquence avec laquelle des têtes régénèrent, mais on observe un pourcentage plus fort de têtes pourvues d'yeux supplémentaires. Le lithium est d'ailleurs toxique pour les planaires, dont il abaisse sans doute la respiration; s'il en est réellement ainsi, il faudrait penser que le gradient de «fréquence des têtes» ne peut être un gradient d'oxydation. Cette déduction est conforme aux conclusions de v. BERTALANFFY.

D'autres chercheurs ont examiné si la régénération est influencée par des substances affectant la division cellulaire, en particulier les corps cancérogènes et les thiols. Les résultats sont d'ailleurs extrêmement discordants: alors que les hydrocarbures cancérogènes accéléreraient la régénération chez les planaires d'après OWEN, WEISS et PRINCE, c'est l'opposé qui serait vrai selon TOKIN: ces substances sont en effet inhibitrices tant chez la planaire que dans les bourgeons de membres chez l'axolotl. On sait d'ailleurs que les corps cancérogènes peuvent inhiber la croissance des cellules normales et cancéreuses (HADDOW), alors que des substances voisines chimiquement, mais non cancérogènes, sont inactives. En ce qui concerne les corps sulphydrylés, F.-S. et D.-W. HAMMETT ont noté une accélération dans le cas de la pince du crabe; OWEN, WEISS et PRINCE, ainsi que COLDWATER ont également obtenu des effets favorables chez la planaire. Au contraire, MORGULIS et GREEN n'ont eu que des échecs dans la régénération d'un polychète, *Podarke*, en ajoutant du thiocrésol, du thiophénol, de l'acide thioglycolique ou de la cystéine. Ce désaccord tient peut-être en partie au fait que les mitoses participent de façon très variable à la régénération.

L'hypothèse d'une intervention des groupes $-SH$ lors de la régénération et de la croissance chez les Hydroïdes se voit cependant appuyée par des observations cytochimiques, effectuées à l'aide de la réaction au nitroprussiate: CHAPMAN a constaté que, chez

Obelia, la réaction est exceptionnellement intense dans les territoires où la croissance est la plus active (fig. 5); le fait fut confirmé par HAMMETT et CHAPMAN qui notèrent en outre une accumulation de tyrosine aux points où la tendance à la différenciation est spécialement marquée; le tryptophane et les polypeptides ne présentent au contraire pas de localisation élective. L'existence de gradients dans la répartition des groupes $-SH$ chez l'hydroïde *Corymorpha* avait d'ailleurs déjà été rapportée par CHILD et HYMAN en 1926; des observations similaires ont été faites

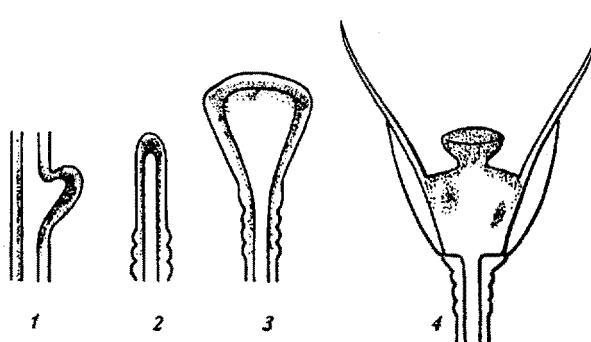


Fig. 5. Localisation des groupes $-SH$ chez l'hydroïde *Obelia* (CHAPMAN).

sur le ver de terre par PERKINS, qui a déterminé quantitativement la teneur en glutathion de divers fragments.

HAMMETT et ses collaborateurs ont consacré une longue suite de travaux à l'action de dérivés des acides nucléiques et de certains acides aminés sur la croissance et la régénération chez *Obelia*; les résultats sont trop complexes pour être analysés ici; retenons que la xanthine tend à mettre en marche la croissance, tandis que la prolifération est accélérée par l'hypoxanthine, la xanthine et l'hydroxyproline; l'adénine, la xanthine et l'allantoïne stimulent l'organisation, alors que la cytosine, l'hydroxyproline et l'acide aspartique favorisent la différenciation.

Le rôle favorable de certains acides aminés ressort aussi des recherches de LECAMP; étudiant les effets de divers acides aminés, pris isolément ou en mélange, LECAMP est amené à attribuer une importance particulière à l'arginine et à l'histidine; ces deux aminoacides basiques, associés à la cystéine et au tryptophane, constituent un milieu très propice à la régénération chez la planaire et le triton; l'arginine favorise aussi la régénération des épithéliums, selon TARANTINO et PASQUINELLI. Ces observations peuvent être rapprochées des idées de EDLBACHER, qui attribue une place importante à l'arginine et à l'histidine dans la croissance des tumeurs et des embryons; on peut les mettre aussi en parallèle avec les résultats de CASSPERSON et THORELL démontrant que la teneur des cellules en acides aminés basiques diminue quand la croissance se ralentit chez le poulet. On doit enfin se demander si l'arginine et l'histidine ne serviraient pas à

la synthèse des purines des acides nucléiques, conformément à une hypothèse souvent avancée, mais jamais démontrée de façon formelle.

5. Métabolisme des protéines et des nucléoprotéides

Ceci nous amène à examiner sommairement ce que l'on sait du *métabolisme des protéines* dans le blastème de régénération: ce problème a retenu l'attention d'OKUNEFF et OREKHOWITCH, à qui on doit quelques travaux intéressants; ils ont surtout étudié les protéases du bourgeon de membre chez l'axolotl et leurs activateurs naturels tels que le glutathion réduit et l'acide ascorbique.

OKUNEFF a montré, dès 1932, que le rH_2 du membre amputé s'abaisse: l'opération fait flétrir le rH_2 de 22 à 20, chiffre auquel il se maintient pendant longtemps; le retour à la valeur normale ne s'opère que quand la régénération est presque complète; l'auteur russe attribue cette diminution du potentiel d'oxydoréduction à une élévation de la teneur en glutathion réduit.

Cette interprétation a été confirmée par les dosages d'OREKHOWITCH (1934): le taux de glutathion réduit passe de 19,6 mg % dans la queue normale à 46 mg % dans le blastème de 5 à 11 jours; le retour à l'état normal se produit ensuite¹. Il semble bien que la teneur en glutathion des tissus avoisinant le blastème s'accroisse aussi et qu'ils soient également le siège d'une protéolyse active. OREKHOWITCH et BROMLEY et OREKHOWITCH (1937) n'ont pas tardé à en apporter la preuve: l'activité de la cathepsine s'élève dans le régénérat et les territoires voisins, sans se modifier dans le restant de l'animal; la teneur en dipeptidase s'élève aussi très fortement et arrive à excéder la normale de 216 %. Enfin, OREKHOWITCH et SOKOLOVA ont vu que les protéines du blastème se laissent plus aisément digérer par la cathepsine que celles de l'animal intact.

Plus récemment, les auteurs russes ont apporté de nouveaux arguments en faveur de leur conception: c'est ainsi que SOKOLOVA a montré qu'il existe un rapport direct entre la teneur en cathepsine de divers tissus adultes et leur pouvoir de régénération, tandis que STRIGANOVA a établi que les bourgeons de membres chez l'axolotl utilisent les produits du catabolisme protéique pour leur régénération.

Ces observations ont été confirmées par RYVKINA: la protéolyse est basse, quand le blastème se constitue et elle s'élève fortement au moment où l'organogénèse y débute; elle revient à la normale lors de la croissance du régénérat. La teneur en glutathion total demeure constante pendant la régénération, mais la proportion de la forme réduite est considérable au début de la régénération et pendant la période d'or-

¹ Il importe cependant de signaler que MALUF a observé au contraire une diminution de la teneur en glutathion du blastème de régénération de la queue.

ganogénèse; elle descend pendant la troisième phase (croissance). C'est aussi au cours des deux premières étapes de la régénération qu'on trouve la plus haute teneur en N aminé et en acide ascorbique. En somme, il se produit une synthèse de cathepsine lors de l'organogénèse du blastème, tandis que cet enzyme est fortement activé, dès que le régénérat se constitue.

Ces travaux établissent clairement que la métabolisme des protéines s'altère profondément lors de la régénération et qu'il atteint son apogée au moment où se produit l'organogénèse du blastème.

Nous savons que les *ribonucléoprotéides* interviennent dans la synthèse des protéines et qu'ils jouent, selon toute apparence, un rôle d'avant-plan dans la morphogénèse chez les amphibiens: en est-il de même dans la régénération? Cette question a fait l'objet d'une étude complète de H. CLÉMENT et a été touchée incidemment par P. BRIEN et par KEDROWSKI: on sait depuis longtemps que des cellules «pluripotentes», peu différenciées et qui constituaient une réserve lors d'une régénération ou de la reproduction asexuée, se distinguent par une forte basophilie: les cellules «intersticielles» de l'hydre appartiennent à cette catégorie et leur affinité pour les colorants basiques tient à la présence d'acide ribonucléique (KEDROWSKI). On a signalé un accroissement de la basophilie pendant la régénération chez les Oligochètes (WEITZMANN) et les Amphibiens (IDE-Rozas); il s'agit en fait d'une synthèse de ribonucléoprotéides, d'après KEDROWSKI; P. BRIEN, au cours de ses recherches étendues sur l'origine des cellules sexuelles et blastogénétiques chez les Hydroïdes, a particulièrement insisté sur les caractères morphologiques constants des cellules reproductrices sexuées ou asexuées: cytoplasme basophile, nucléole volumineux et très colorable par les colorants basiques. Ces modifications se manifestent, lorsque ces cellules se libèrent de l'organisme et commencent à croître; la basophilie cytoplasmique et nucléolaire régresse au moment où la gamétogénèse ou la croissance du bourgeon débutent. L'emploi de la ribonucléase a permis à BRIEN de préciser que l'affinité pour les colorants basiques est bien exclusivement due à de l'acide ribonucléique.

Quant à H. CLÉMENT, elle a étudié la répartition des ribonucléoprotéides pendant la régénération chez la planaire, le têtard de grenouille, le triton et la cicatrisation de la peau chez la souris. On retrouve les mêmes faits partout, mais les images sont particulièrement démonstratives chez la planaire: l'organisme normal ne présente pas de gradient dans la répartition de l'acide ribonucléique, ainsi que nous l'avaient déjà démontré des dosages de pentoses; les divers organes ont une richesse très variable en cet acide: la peau et les muscles n'en contiennent que fort peu, alors que le tube digestif en est abondamment pourvu; le mésoderme a une teneur modérée en acide ribonucléique; celui-ci s'accumule surtout dans

les lécithocytes destinés à synthétiser le vitellus. Lorsqu'on sectionne la tête de l'animal, le blastème se reconnaît aussitôt à sa teneur plus élevée en acide ribonucléique; les cellules de la peau en voie de régénération se distinguent aussi par une plus forte basophilie sensible à la ribonucléase. Il est malaisé de décliner si le blastème se forme par migration de cellules déjà riches en acide ribonucléique ou si ce dernier se synthétise sur place; H. CLÉMENT se rallie à cette seconde éventualité, de façon catégorique en ce qui concerne l'épiderme. Notons encore que la teneur en acide thymonucléique des noyaux paraît quelque peu en hausse dans le blastème, à en juger par l'intensité de la réaction de FEULGEN.

Enfin, H. CLÉMENT a suivi cytochimiquement la répartition du glycogène pendant la régénération chez la planaire: elle n'a pas constaté d'augmentation dans le blastème, contrairement à l'opinion courante qui veut que le glycogène abonde partout où il y a croissance. CASTRO RODRIGUEZ et N. POURBAIX notamment avaient signalé la grande richesse en glycogène des cellules qui donnent naissance aux bourgeons dans la reproduction asexuée chez les Eponges et les Tuniciers. Les résultats de H. CLÉMENT concordent en tous cas avec ceux que PRETO PARVIS a fait récemment connaître: pour l'auteur italien, il n'y a aucune corrélation entre la teneur en glycogène d'une cellule et son aptitude à la prolifération; le glycogène ne disparaît pas pendant la mitose, à l'inverse de ce qu'on croit communément.

Ajoutons encore que des résultats semblables à ceux obtenus par H. CLÉMENT ont été rapportés par ROSKIN et KHARLOVA dans le cas des membres d'axolotl en voie de régénération; les cellules des tissus musculaire et cartilagineux du régénérat se distinguent par leur grande richesse en acide ribonucléique; celui-ci tend à disparaître lors de la différenciation ultérieure du régénérat.

6. Conclusions

Une comparaison approfondie de la biochimie du régénérat avec celle de l'embryon nous entraînerait trop loin et nous nous bornerons donc, en guise de conclusion, à esquisser un rapide parallèle entre les deux.

On observe, dans le régénérat comme dans l'embryon, un métabolisme intense des glucides; la consommation d'oxygène s'élève en général fortement au moment où la régénération débute: il en va de même chez l'oeuf de grenouille ou celui de la sauterelle. Le mécanisme intime des oxydations demeure inconnu, mais dans les deux cas il s'agit d'une respiration sensible au cyanure, donc probablement catalysée par des hémines. Il semble toutefois que dans le régénérat, comme dans la gastrula, une faible partie seulement de l'énergie fournie par les oxydations soit utilisée pour assurer la morphogénèse.

La question des gradients de métabolisme est plus délicate à trancher: si le cas de *Tubularia* est, somme toute, favorable à la théorie de CHILD, la démonstration de l'existence de gradients métaboliques chez les autres espèces aptes à la régénération demeure imparfaite. Il en va de même chez l'embryon: des variations graduelles de la consommation d'oxygène dans les différents territoires de la gastrula existent certainement chez les Batraciens, mais elles sont dues au fait que la répartition du cytoplasme et du vitellus se fait, grossièrement, en gradients: le vitellus est, en effet, inerte au point de vue des échanges respiratoires. Notons d'ailleurs que ces gradients de métabolisme, chez la gastrula de Batraciens, ne sont pas de nature purement quantitative, comme le veut la théorie de CHILD: la moitié dorsale de la gastrula se distingue de la partie ventrale par l'apparition beaucoup plus précoce d'un métabolisme à prépondérance glucidique, comme l'ont montré NEEDHAM et ses collaborateurs et nous-même. Dans les œufs pauvres en vitellus (oursin) et dans le blastoderme isolé de l'œuf de poule, on n'a pu déceler de gradients dans l'intensité de la consommation d'oxygène.

Un métabolisme protéique intense, accompagné d'une accumulation d'acide ribonucléique, caractérise la morphogénèse du régénérat et celle de l'embryon. La richesse en ribonucléoprotéides se comprend aisément; du fait que ces substances jouent, selon toute apparence, un rôle important dans la synthèse des protéines (J. BRACHET, CASPERSSON). On conçoit sans peine que l'organogénèse et la différenciation soient la conséquence de l'élaboration de protéines spécifiques, premier stade de la chimiodifférenciation; on s'explique bien aussi que lorsque les protéines se sont synthétisées et que la différenciation est réalisée, la teneur en ribonucléoprotéides diminue. Le comportement de ces substances au cours de la régénération et du développement embryonnaire est donc parfaitement logique.

Il est à noter, à ce propos, qu'on ne peut déceler de gradient dans la répartition des ribonucléoprotéides dans la planaire intacte; une telle constatation est défavorable à la théorie de CHILD et il semble donc qu'il n'existe pas de gradient continu dans la synthèse des protéines le long d'un organisme aussi complexe qu'une planaire.

Il ne faut pas oublier que le phénomène même de la régénération entraîne des changements chimiques dans la région sectionnée: il se forme un blastème riche en ribonucléoprotéides et à respiration élevée. Ces deux propriétés du blastème sont probablement étroitement liées, car on sait maintenant que l'acide ribonucléique et certains enzymes respiratoires importants sont fixés sur de mêmes granules (STERN, BRACHET et JEENER, CHANTRENNE). Il existe d'ailleurs un parallélisme parfait entre la teneur en ribonucléoprotéides et la consommation d'oxygène des diverses régions de la gastrula de Batraciens, comme nous l'avons montré. Il se produit donc, lors de la régénération, une synthèse ou une accumulation de granules ribonucléoprotéiques à métabolisme intense; cette synthèse a lieu dans le blastème et est une conséquence de la section. On peut se demander dès lors si la théorie de CHILD n'est pas trop «préformationniste» et s'il ne faut pas tenir compte plus largement de «facteurs épigénétiques» déclenchés par l'opération. Il serait intéressant, afin d'éprouver une telle hypothèse, d'étudier la teneur en acide ribonucléique et le métabolisme de blastèmes de régénération provoqués à différents niveaux d'un organisme.

Summary

A survey of the biochemistry of regenerating animals has been made: after a critical discussion of CHILD's metabolic gradients theory, the relative importance of respiration rate, carbohydrates, proteins and nucleic acids metabolism are stressed. The similarities between biochemical processes in the embryo and the regenerating organism are pointed out.

Die biologische Bedeutung der Vitamine

Von M. GUGGENHEIM, Basel¹

Geleitet von der durch LAVOISIER erbrachten Aufklärung der Verbrennungs- und Atmungsvorgänge, hat die im 19. Jahrhundert mächtig aufblühende chemische und biochemische Forschung auch in die stofflichen und energetischen Bedürfnisse der Pflanzen- und Tierwelt tieferen Einblick gewonnen. Sie gelangte dabei zu der Erkenntnis, daß die grünen Pflanzen ihre Körpersubstanz aus der Kohlensäure der Luft mit Hilfe

der Sonnenenergie und der aus dem Boden oder dem Wasser aufgesogenen anorganischen Nährstoffe (Wasser, Mineralsalze, Ammoniak oder Nitrate) aufzubauen vermögen, während Menschen und Tiere für ihre Entwicklung und Erhaltung außer den anorganischen Nährstoffen auch organische benötigen, die sie mit der pflanzlichen und tierischen Nahrung einnehmen. Von diesen ihrer chemischen Natur nach recht mannigfaltigen *organischen Nährstoffen* galten seit LIEBIGS grundlegenden Forschungen die Kohlehydrate, Fette

¹ Wissenschaftliche Abteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co., AG., Basel.