

Culture *in vitro* de blastèmes de régénération de Planaires

par CATHERINE SENDEL¹

Laboratoire d'Embryologie expérimentale du Collège de France et du C.N.R.S., Paris

INTRODUCTION

LES problèmes de la régénération ont donné lieu à des recherches particulièrement approfondies chez les planaires, animaux dont le pouvoir de régénération est extraordinairement élevé. De nombreux auteurs ont étudié les modalités de la reconstitution, après une amputation, des divers organes et parties du corps de la planaire. De quel matériel cellulaire est constitué le jeune blastème de régénération? Quelle est l'origine, quelle est la nature de ces cellules? Wolff & Dubois, en 1947 et 1949, ont contribué à répondre à ces questions. Grâce à une méthode d'irradiations localisées aux rayons X, ces auteurs ont montré l'existence, chez les planaires, de cellules spéciales, migratrices, les néoblastes. Après une amputation, ces cellules affluent vers la surface de section et vont constituer le blastème de régénération. Les néoblastes sont des cellules indifférenciées, à gros noyau, au cytoplasme peu abondant. Elles présentent une grande activité mitotique, et sont totipotentes. Ces caractères sont ceux de cellules embryonnaires. Le jeune blastème peut donc être considéré comme une véritable ébauche embryonnaire, dont il nous a paru intéressant de connaître le destin lorsqu'elle est séparée de l'organisme qui lui a donné naissance: nous avons tenté de cultiver *in vitro* les blastèmes de régénération encore indifférenciés, en utilisant la méthode de culture mise au point par Wolff & Haffen (1952), à laquelle nous avons apporté certaines modifications.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Toutes les expériences ont porté sur des animaux de l'espèce *Dugesia lugubris*.

Préparation des blastèmes utilisés pour la culture

Les planaires ont été opérées de manière à fournir des blastèmes de régénération de deux sortes: blastèmes antérieurs (futurs têtes), d'une part; blastèmes postérieurs (futurs queues), d'autre part.

Elles sont coupées transversalement en arrière des yeux et des auricules, et au niveau de l'orifice génital (fig. 1A). Le tronçon médian ainsi obtenu va édifier

¹ *Author's address*: Laboratoire d'Embryologie expérimentale du Collège de France, 49^{bis} Avenue de la belle Gabrielle, Nogent-sur-Marne, Seine, France.

un blastème céphalique vers l'avant, et un blastème caudal vers l'arrière (fig. 1B). Nous avons aussi utilisé les blastèmes de queue obtenus à partir de la tête (fig. 1C).

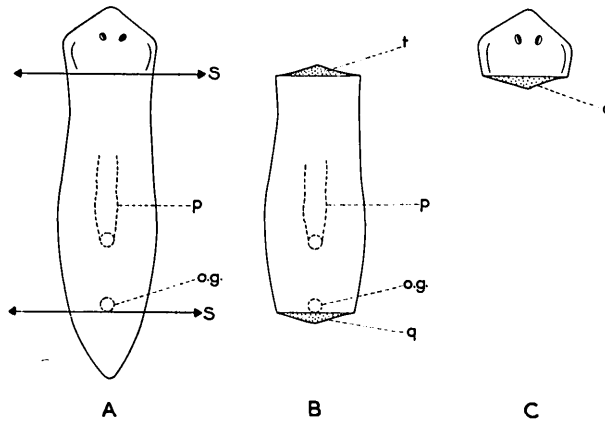


FIG. 1. Sections et formation des blastèmes. A. Sections pratiquées sur une planaire. B. Régénération du tronçon médian. C. Régénération de la tête. *o.g.*, orifice génital ♂; *p*, pharynx; *q*, blastème caudal; *s*, niveaux des sections; *t*, blastème céphalique.

Les blastèmes sont prélevés deux à trois jours après l'opération. A ce stade de la régénération, ils se présentent sous forme d'une petite languette étroite, non pigmentée et translucide. Aucune différenciation n'est encore visible.

Milieu de culture

La solution physiologique utilisée est le liquide de Holtfreter. Nous avons essayé des concentrations variées de cette solution (1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{10}$). Les plus favorables à la cicatrisation des explants sont les concentrations 1 et $\frac{1}{2}$.

Les bourgeons sont placés sur un milieu de culture solide et nutritif, contenant: 5 parties de gélose à 1 pour cent dans la solution de Holtfreter; 4 parties de solution de Holtfreter additionnée de glucose à 1 pour mille; 3 parties d'extrait d'embryon de poulet de 9 jours, dilué à 50 pour cent dans la solution de Holtfreter. L'extrait d'embryon s'est montré favorable à la survie des bourgeons. Dans certains cas, nous avons enrichi le milieu en y ajoutant une solution de plusieurs acides aminés.

Toutes les cultures ont été faites à une température de 18–20° C.

Asepsie des cultures

L'épiderme des bourgeons est couvert de germes qui risquent d'infecter les milieux et qu'il faut éliminer. Comme l'a fait Murray (1927, 1931), nous exposons les planaires entières, avant de prélever les bourgeons, aux rayons ultra-violet. Pendant le traitement, qui dure 4–5 minutes, les planaires sont recouvertes d'un film d'eau aussi mince que possible. Ensuite les animaux sont rincés assez longuement (30 minutes environ) dans 2 bains successifs d'eau stérile additionnée

de pénicilline. Alors seulement les bourgeons sont prélevés et placés sur le milieu qui contient également de la pénicilline.

Toutes ces précautions nous ont permis d'avoir des cultures stériles. D'autre part, ni les rayons ultra-violet, ni l'antibiotique utilisé, ne sont nuisibles aux planaires, dont le pouvoir de régénération, en particulier, reste intact.

RÉSULTATS

Nous avons fait des expériences de deux types: (1) culture de bourgeons de tête ou de queue isolés; et (2) culture d'associations de bourgeons de tête ou de queue.

CULTURE DE BLASTÈMES ISOLÉS

Au moment du prélèvement, le blastème présente une très grande surface de section. Parfois, les cellules du blastème commencent à s'échapper par la blessure et se dispersent à la surface du milieu. Mais après 24 heures de culture, la blessure est parfaitement cicatrisée, et les tissus cessent de migrer.

Les jours suivants, le blastème en culture devient un petit nodule plus ou moins sphérique, qui s'aplatit ensuite et prend la forme d'une lentille bien ronde.

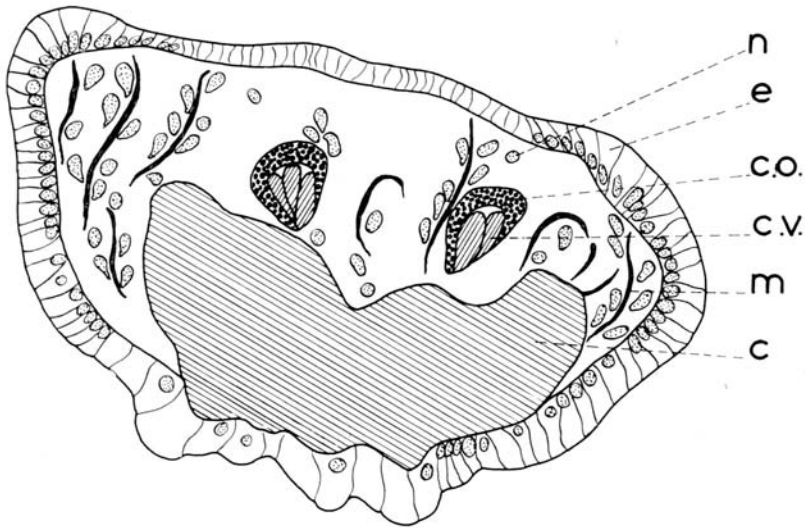


FIG. 2. Coupe d'un blastème céphalique ayant différencié un cerveau et 2 yeux. *c.*, cerveau; *c.o.*, cupule oculaire; *c.v.*, cônes visuels; *e.*, épiderme; *m.*, muscles; *n.*, néoblastes.

Dans cet état, les blastèmes survivent en moyenne 10 à 15 jours. Toutefois, certaines cultures ont pu être prolongées jusqu'à 3 ou 4 semaines. Pendant tout ce temps, les explants se sont maintenus à leur taille initiale. Nous n'avons pas observé de croissance notable. Par contre, les blastèmes sont capables de se différencier en culture. Les principales différenciations que nous avons remarquées sont les suivantes:

(a) Après 3 jours de culture, les explants commencent à se pigmenter. Le pigment apparaît sous forme de grains épars qui deviennent de plus en plus nombreux. La pigmentation progressive des bourgeons de régénération en culture est très semblable à celle que l'on observe *in vivo*. Toutefois, même après 4 semaines de culture, jamais les explants n'ont atteint une coloration aussi intense que celle de tissus adultes.

(b) Le 4^e ou le 5^e jour après la mise en culture, les bourgeons commencent à bouger. On observe des contractions particulièrement nettes lorsqu'on les éclaire fortement. Des muscles se sont donc différenciés. Leur existence est confirmée par l'observation au microscope (fig. 2).

(c) Le troisième type de différenciation ne concerne que les blastèmes antérieurs (les têtes présomptives). Sept à huit jours après le début de la culture, on voit apparaître une ou deux taches pigmentaires, nettement plus importantes

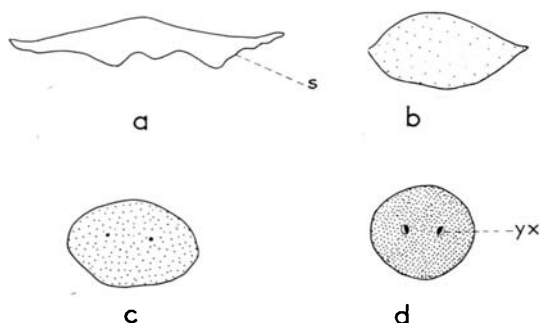


FIG. 3. Différenciation *in vitro* d'un blastème céphalique. a—mise en culture; b—48-72 heures; c—8 jours; d—10-15 jours. s, surface de section; yx, yeux.

que les grains de pigment qui colorent l'ensemble de l'explant. Les jours suivants, ces taches deviennent des yeux bien différenciés (fig. 3). Dans l'ensemble, la différenciation des yeux en culture se fait entre le 8^e et le 15^e jour, alors qu'*in vivo*, les yeux apparaissent dans un blastème céphalique environ 6 jours après le début de la régénération.

TABLEAU 1

Culture de blastèmes céphaliques isolés

	<i>Nombre total de blastèmes mis en culture</i>	<i>Blastèmes non cicatrisés (morts avant le 4^e jour de culture)</i>	<i>Blastèmes cicatrisés normalement (après 24 heures de culture)</i>	<i>Blastèmes ayant différencié des yeux en culture (entre le 8^e et le 15^e jour)</i>
Série I milieu standard	42	8	34	22
Série II milieu avec acides aminés	26	2	24	13

Le tableau 1 donne, à titre d'exemple, les résultats de deux séries expérimentales: la série I sur le milieu standard (jus d'embryon), et la série II sur un milieu enrichi en acides aminés (jus d'embryon, et une solution de 9 acides aminés).

Lorsqu'on cultive des blastèmes céphaliques pris à des niveaux situés plus caudalement (en arrière du pharynx, par exemple), la proportion des yeux différenciés en culture est nettement plus faible que dans le cas des blastèmes formés à un niveau très antérieur. Sur 18 bourgeons pris au niveau de la bouche, 2 seulement ont différencié des yeux, après 15 jours de culture. Seize bourgeons pris au niveau de l'orifice génital n'ont donné aucune différenciation oculaire. Comme l'a montré Brønsted (1956), il existe un gradient le long du corps de la planaire, le 'time-graded regeneration-field': plus on s'éloigne de la tête, plus la régénération des yeux se fait tard. Ceci explique pourquoi, en culture, les blastèmes pris à des niveaux postérieurs à la bouche n'ont pas le temps de différencier des yeux avant qu'ils ne commencent à se désagréger.

L'examen histologique a montré que tous les blastèmes céphaliques qui ont différencié des yeux en culture, et qui ont été coupés et colorés, possèdent un cerveau (fig. 2). Ce résultat est en accord avec ceux de Lender (1950). Selon cet auteur, en effet, le cerveau des planaires émet une substance nécessaire à la différenciation des yeux.

Dans les bourgeons postérieurs (les queues présomptives) que nous avons cultivés, nous n'avons jamais obtenu aucune différenciation oculaire ni nerveuse. Il semble donc que, dans les conditions de nos expériences, seuls les blastèmes céphaliques soient capables de donner un cerveau et des yeux.

Nous avons vu que la culture de blastèmes de régénération isolés donne 3 types de différenciation: pigment, muscles, yeux et cerveau dans les bourgeons antérieurs. Des expériences de culture de plusieurs blastèmes associés ont apporté de nouveaux résultats. Un quatrième type de différenciation a été obtenu, en effet, à partir de certaines associations.

CULTURE DE BLASTÈMES ASSOCIÉS

Nous avons utilisé des blastèmes céphaliques et caudaux du même âge (2 à 3 jours) que dans les expériences précédentes. Deux ou plusieurs bourgeons, placés sur le milieu de culture, sont ensuite accolés par leurs surfaces de sections. Nous cultivons ces associations exactement de la même manière que les bourgeons isolés. Les divers éléments fusionnent rapidement et avec une grande facilité: après 24 à 48 heures, l'ensemble est en général parfaitement cicatrisé. Si, au départ, les surfaces de sections des différents bourgeons coïncident assez exactement, la cicatrisation est même plus aisée que dans le cas des bourgeons isolés. La survie est également plus longue en général, lorsque les blastèmes sont cultivés en associations: elle est de 20 à 25 jours en moyenne, si les blastèmes ont fusionné intimement.

Nous avons réalisé les associations suivantes : 2, 3 ou 4 blastèmes céphaliques ; 2, 3 ou 4 blastèmes caudaux ; 1 blastème céphalique avec 1 ou 2 blastèmes caudaux.

Associations de blastèmes céphaliques

L'ensemble prend une forme régulièrement arrondie, et des yeux se différencient dans le délai habituel. Il y a 1 ou 2 yeux par blastème. On obtient donc une sorte de tête ronde, aplatie, avec des yeux en surnombre (fig. 4).

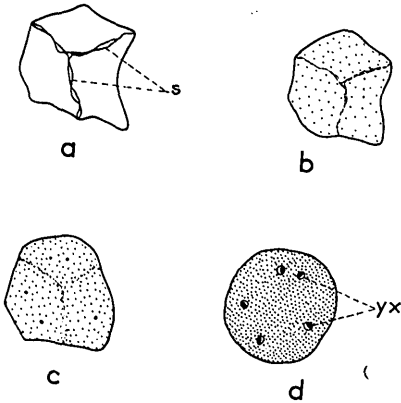


FIG. 4. Différenciation *in vitro* d'une association de 3 blastèmes céphaliques. Même légende que fig. 3.

Associations de blastèmes caudaux

L'évolution de la forme est la même, mais il n'y a jamais d'yeux.

Associations de blastèmes céphaliques et caudaux

Ce type d'association présente un changement de forme très caractéristique pendant les 8 à 10 premiers jours de la culture. En effet, quelle que soit sa forme au départ, un tel ensemble a toujours une forte tendance à s'allonger dans le sens céphalo-caudal. Les contours, d'abord irréguliers, s'arrondissent après le 3^e jour,

et, en s'allongeant, l'association finit par acquérir la forme d'une très petite planaire. La partie céphalique présumptive de l'ensemble constitue la tête, le ou les blastèmes caudaux la queue (fig. 5).

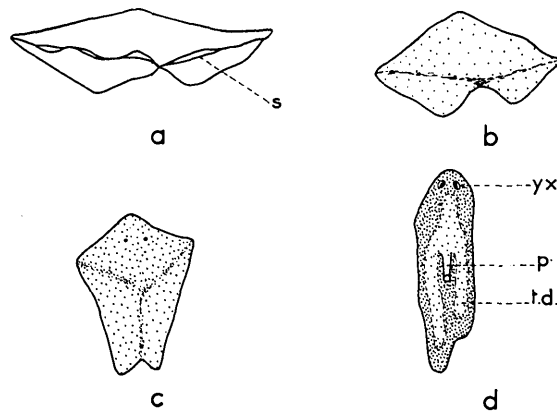


FIG. 5. Différenciation *in vitro* d'une association d'1 blastème céphalique avec 2 blastèmes caudaux. Même légende que fig. 1 et 3; *t.d.*, tube digestif.

Les différenciations déjà observées dans les expériences sur les blastèmes cultivés seuls, apparaissent dans les délais habituels: pigment, muscles, yeux dans le blastème céphalique. Nous avons obtenu un 4^e type de différenciation dans ces associations de blastèmes céphaliques et caudaux. Entre le 10^e et le 15^e jour de culture, un pharynx apparaît dans la partie médiane de ces petites planaires. Se raccordant au pharynx, une ébauche de tube digestif à 3 branches a pu être vue par transparence dans certains cas. Sur 32 associations, 10 se sont ainsi différenciées en planaires pourvues d'un pharynx. Il faut noter qu'en culture le pharynx est apparu 3 à 4 jours après la formation des yeux, alors que, *in vivo*, les yeux et le pharynx se différencient presque simultanément dans un blastème de régénération.

TABLEAU 2

Culture d'associations de blastèmes céphaliques et de blastèmes caudaux

<i>Nombre total d'associations mises en culture</i>	<i>Associations non réussies (blastèmes non fusionnés, ou non cicatrisés)</i>	<i>Associations réussies (blastèmes fusionnés après 24 heures de culture)</i>	<i>Associations ayant survécu au delà du 10^e jour de culture</i>	<i>Associations ayant différencié des yeux</i>	<i>Associations ayant différencié un pharynx</i>
34	2	32	14	14	10

Ces petites planaires nées *in vitro* semblent très bien adaptées au milieu de culture, où elles survivent 8 à 10 jours. D'autres ont été transplantées dans un milieu liquide (solution de Holtfreter diluée): elles s'y déplacent activement, mais n'y survivent pas plus de 4 à 5 jours. Le tableau 2 donne les résultats de la série expérimentale ayant différencié des pharynx.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces recherches, démontre que la culture *in vitro* des blastèmes de régénération de planaires est possible: s'ils sont placés dans un milieu approprié, les bourgeons sont capables de survivre séparés de l'organisme qui leur a donné naissance. La méthode de culture utilisée permet également leur différenciation *in vitro*.

Une conclusion se dégage nettement des résultats de ces expériences: les blastèmes de régénération, même très jeunes, sont déjà *déterminés*, et leur polarité est fixée. En effet, un bourgeon antérieur donne toujours une tête, un bourgeon postérieur jamais. Pour la différenciation d'un pharynx et d'un tube digestif, la réunion d'un bourgeon céphalique et d'un bourgeon caudal est nécessaire. Pourquoi un blastème céphalique seul n'est-il pas capable de donner un pharynx? Il a été prouvé, en effet, qu'une tête induit normalement la différenciation d'un pharynx, et l'on peut se demander pourquoi il n'en est pas ainsi en culture. On doit admettre qu'un seul bourgeon n'apporte pas assez de matériel cellulaire pour permettre la différenciation d'organes digestifs, en plus des

différenciations nerveuse et oculaire. Pourtant, les associations de plusieurs blastèmes céphaliques sont aussi volumineuses que les associations mixtes d'un blastème céphalique et d'un blastème caudal, et ne peuvent cependant pas différencier un pharynx. Sans doute une telle association de 3 ou 4 blastèmes céphaliques, une fois différenciée, pourvue de ses cerveaux et de ses yeux, est-elle comparable à ces formations hétéromorphiques que l'on obtient parfois *in vivo*, les têtes bipolaires, par exemple. Dans ces cas spéciaux non plus, la reconstitution d'un pharynx n'est en général plus possible. L'association d'un blastème céphalique avec un blastème caudal, au contraire, tout en fournissant un matériel cellulaire suffisamment abondant, donne à l'ensemble les moyens d'accomplir un développement harmonieux qui conduit à l'édification d'une petite planaire pourvue de ses principaux organes.

RÉSUMÉ

1. De jeunes blastèmes de régénération de planaires ont été cultivés *in vitro* à l'aide de la méthode de culture de Wolff & K. Haffen, légèrement modifiée.

2. *Culture de blastèmes isolés.* Les blastèmes en culture se cicatrisent et survivent sur le milieu pendant 10 à 15 jours. Le milieu utilisé ne permet pas la croissance, mais les différenciations suivantes ont été obtenues : pigment (3^e jour); muscles (4^e–5^e jours); et yeux et cerveau (8^e–15^e jours). Ces 3 types de différenciation ont été observés dans les blastèmes de régénération antérieure (futurs têtes), les 2 premiers seulement dans les blastèmes postérieurs (futurs queues).

3. *Culture de blastèmes associés.* Une association de 2 ou plusieurs blastèmes céphaliques donne une tête avec des yeux en surnombre. Une association de 2 ou plusieurs blastèmes caudaux ne différencie jamais d'yeux ni de cerveau. Une association d'1 blastème céphalique avec 1 ou 2 blastèmes caudaux donne une petite planaire pourvue d'un pharynx et d'un tube digestif.

4. Les résultats des expériences démontrent d'une part que la culture *in vitro* de jeunes blastèmes de régénération de planaires est possible, d'autre part que les blastèmes sont déterminés très précocement : les blastèmes antérieurs donnent des têtes, les blastèmes postérieurs au contraire ne sont pas capables de donner des différenciations céphaliques. Les blastèmes antérieurs associés aux blastèmes postérieurs reconstituent de petites planaires complètes.

SUMMARY

1. Young regeneration blastemata of Planarians have been cultivated *in vitro* on an agar-embryo extract culture medium which is a modification of the organ culture medium devised by Wolff & Haffen.

2. Transverse cuts were made in whole worms and 3 days later the blastemata were isolated on the culture medium, where they survive for 10–15 days. There is no visible growth, but the observations reveal pigment formation by the third day, the appearance of muscles on the fourth or fifth day, and the presence of

the eyes and brain by the tenth day. All three types of differentiation have been observed in the cultures of head blastemata, but only pigment and muscles are present in the cultures of tail blastemata.

3. When two or more head blastemata are cultured together they differentiate into a larger head with supplementary eyes. The association of two or more tail blastemata does not result in the differentiation of eyes or brain. The combination of one head blastema with one or two tail blastemata in such cultures gives rise to a small planarian with a pharynx and a gut.

4. The method of culturing regeneration blastemata *in vitro* reveals that the fate of the blastemata is determined quite early. A head blastema can differentiate cephalic structures, whereas a tail blastema cannot. However, if a head blastema is associated with a tail blastema in culture, then they differentiate into a complete planarian.

TRAVAUX CITÉS

- BRØNSTED, H. V. (1956). Experiments on the time-graded regeneration-field in Planarians. *Biol. Medd. Abb.* **23**, 1-39.
- DUBOIS, F. (1949). Contribution à l'étude de la migration des cellules de régénération chez les planaires dulcicoles. *Bull. biol.* **83**, 213-83.
- LENDER, TH. (1950). Démonstration du rôle organisateur du cerveau dans la régénération des yeux de la Planaire *Polycelis nigra* par la méthode des greffes. *C.R. Soc. Biol. Paris*, **144**, 1407-9.
- MURRAY, M. (1927). Cultivation of planarian tissues *in vitro*. *J. exp. Zool.* **47**, 467.
- (1931). *In vitro* studies of planarian parenchyma. *Arch. exp. Zellforsch.* **11**, 656-68.
- WOLFF, ÉT., & DUBOIS, F. (1947). Sur une méthode d'irradiation localisée permettant de mettre en évidence la migration des cellules de régénération chez les Planaires. *C.R. Soc. Biol. Paris*, **141**, 17-18.
- & HAFFEN, K. (1952). Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.* **10**, 463-72.

(Manuscript received 4 : v : 60)