Mémoire sur des molécules stimulant la régénération

Autor(en): **Taban, Charles / Walker, Johanna / Cathieni, Maria**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences [2004-ff.]**

Band (Jahr): **69 (2017)**

Heft 2

PDF erstellt am: **23.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-825733

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mémoire sur des molécules stimulant la régénération[1]

Charles TABAN[2], Johanna WALKER[3] et Maria CATHIENI[4]

Ms. reçu le 12 janvier 2017, accepté le 20 juin 2017

Abstract

Action and interaction of three endogenous molecules on Hydra regeneration. – *Three Hydra endogenous molecules were tested for their effects on Hydra head regeneration, namely Hydra head activating substance (HHA), substance P (sP) and hypoxanthine (Hy). More than 25'000 beheaded animals were submitted to the experiments under strictly monitored conditions. Measures of regeneration were given by the number of new tentacles emerging. sP 1-11 at concentrations of 10^{-6} to 10^{-12} M stimulated regeneration but 10^{-4} M and 10^{-5} M inhibited it. This inhibition appeared associated with the fragment sP 1-4, while other sP fragments stimulated regeneration. Two sP antagonists inhibited regeneration.*

Dose-response curves showed that HHA and sP stimulated from 10^{-6} to 10^{-12} M, while Hy stimulated from 10^{-4} to 10^{-20} M with a peak at 10^{-14} M, when the two other molecules had no effect.

Addition of each molecule to one of the other two increased sharply the stimulation, sometimes up to more than the double of the addition of that obtained by each one. While Hy always increased the stimulation of the other succeeding molecules, HHA, a morphogenetic factor, decreased the stimulations due to Hy. sP is a neuropeptide and, as in other models, could stimulate mitoses. Hy, studied here for the first time is an endogenous molecule of Hydra. It is a product of the nucleic acid metabolism and appeared as a new strong regeneration stimulating factor, probably by providing elements for the nucleic acids formation of the regenerate.

These results are discussed in view of their implications within the general regeneration processes.

Keywords: Hydra attenuata, *regeneration, Hydra head activating substance, substance P, hypoxanthine*

Introduction

C'est au cours des recherches sur les molécules présentes dans les extraits d'hydre qui stimulaient la régénération de la tête de ce cœlentéré, qu'une fraction active a été isolée qui, par chromatographie, co-éluait avec la substance P (sP) du commerce. Nous avions décrit précédemment la présence de la sP par immunofluorescence chez *Hydra attenuata* (Fig. 1) (Taban et Cathieni 1978a) et la stimulation de la régénération de la tête d'hydre par la sP (Taban et Cathieni 1978b). Pour mieux voir ses effets sur la régénération de la tête d'hydre, nous avons testé, à plusieurs concentrations, les fragments de la molécule sP ainsi que deux antagonistes. Un autre élément de l'extrait d'hydre, différent de la sP, s'est montré très actif pour stimuler la régénération de la tête de cet animal. Pour en obtenir une quantité suffisante pour son identification, nous avons réalisé des extraits d'*Actinia equina*, cœlentéré marin plus volumineux que l'hydre. Nous avons ainsi pu isoler une fraction d'*Actinia* co-éluant avec une fraction très active de l'extrait d'hydre, ce qui a permis d'en déterminer la nature. C'était de l'hypoxanthine (Hy), molécule produite par le métabolisme des acides nucléiques et considérée alors comme un métabolite sans intérêt particulier. Comme elle était disponible sur le marché, elle a pu être testée. Nous n'avons pas trouvé, à ce jour dans la littérature d'article relatant cet effet de l'hypoxanthine.

Les effets de l'Hy sur la régénération de la tête d'hydre ont donc été comparés avec ceux de la sP et de ses fragments et avec ceux de l'hydra head activating substance (HHA) isolée et décrite par Schaller (1973a et b) et Schaller et Bodenmüller (1981).

[1] Les expériences qui conduisent à ce mémoire ont été pratiquées il y a plus de trente ans et n'ont jamais été publiées en raison d'événements tout à fait indépendants du sujet. Elles ont été conduites dans mon laboratoire de neurobiologie, à la clinique de Bel-Air, à Genève, (devenue depuis clinique de Belle Idée) par Maria Cathieni, biologiste et Johanna Walker, laborantine. Les résultats présentés ici ont été obtenus chez l'hydre d'eau douce, *Hydra attenuata*. Plus de 25 mille hydres ont été soumises aux tests.

[2] *59b ch. des Falquets, 1223 Cologny*
[3] *Süsslerenstrasse 4, 8047 Zürich*
[4] *58 Chemin Frank Thomas, 1223 Cologny*

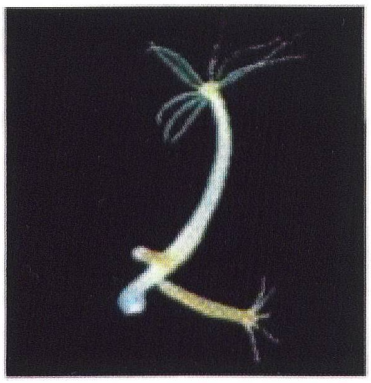

*Fig. 1. Spécimen d'hydre d'eau douce (*Hydra attenuata*). Taille en extension: 2 cm, mais contractée: 1-2 mm.* Hydra attenuata *a été utilisée pour ces expériences. La tête est couronnée de tentacules urticants qui saisissent les proies. La bouche est au centre du cercle et sert aussi d'anus pour expulser les aliments digérés. Le pied est ici décollé. Un peu au-dessus on voit, avec bouche et tentacules, une nouvelle hydre en formation qui va se détacher pour donner un nouvel animal. Juste au-dessus de l'attache de la petite hydre en formation, on voit un court bourgeon qui va grandir et donner, lui aussi, une nouvelle hydre. Les glandes sexuelles, responsables de la reproduction à certains moments, ne sont pas présentes sur la figure.*

Matériel et méthode

Les hydres ont été élevées au laboratoire à partir de quelques individus collectés dans un petit étang situé près de Genève et reproduites asexuellement. Les *Actinia equina* ont été achetées dans le commerce. Des *Artemia salina nauplia* ont servi de nourriture quotidienne aux hydres. Ces *Artemia* ont été dispensées à 11 heures, le milieu étant changé une heure plus tard et aussi à 8 heures le matin suivant.

Les cultures de masses d'hydres ont été effectuées selon la méthode décrite par Lehnhoff (1983). En bref, les hydres ont été mises dans de l'hydra medium «M» (HM), pH 7,9 à 18 ± 1°C, à la lumière du jour et dans une enceinte à température contrôlée.

Par groupes, 25 à 30 hydres dépourvues de bourgeon et à jeun depuis 22 h ont été sélectionnées et décapitées sous le binoculaire entre 10 et 11 h du matin. Pour exclure toute contamination, l'HM employé pour les expériences (HME), a été ajusté à un pH de 7,6 et filtré à travers un millipore (0, 25 µm). Chaque groupe a été rincé avec HME et placé dans des cristallisoirs contenant 20 ml d'HME additionné des molécules à tester. Les groupes d'hydres décapitées ont été placées dans un incubateur à 17 ± 0.1 °C, avec des cycles de lumière artificielle de 12 h alternant automatiquement avec 12 h d'obscurité. Cinq heures après l'incubation, le milieu a été éliminé et chaque groupe d'hydres (et les cristallisoirs) lavés deux fois avec de l'HME pour éliminer tout résidu des molécules ajoutées pour les tests. Ensuite, 20 ml de nouvel HME a été ajouté. 46 ± 1 h après la décapitation, le nombre des tentacules présents a été compté sous le binoculaire.

Pour s'assurer de l'objectivité, l'observateur ignorait si le groupe mesuré avait été traité ou s'il s'agissait d'un groupe contrôle (C). Pour chaque essai, le groupe témoin a été comparé au groupe traité le même jour. Chacun de ces essais a été répété trois fois, chaque essai ayant un ou deux jours d'écart avec le suivant. Des statistiques par rank-sum-test ont été appliquées aux résultats donnés par chaque unité d'un groupe traité par rapport au groupe témoin et les moyennes sont données avec les écarts-type.

Tous les produits utilisés dans cette étude ont été achetés chez Sigma. La substance P 1-11 (sP), de formule: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met, ainsi que ses divers fragments: sP 1-4; sP 4-11; sP 5-11; sP 6-11; sP 7-11; les deux antagonistes de la sP nommés A1 (D-Pro^2, D-Trp$^{7-9}$) ou A2 (D-Pro^2, D-Phe^7, D-Trp^9); l'hypoxanthine (Hy), 6-oxypurine: $C_5H_4N_4O$ et l'hydra head activating substance (HHA): pGlu,-Pro-Pro-Gly-Gly-Ser-Lys-Val-Ila-Leu-Phe.

Chaque molécule a été testée individuellement à concentrations croissantes pour déterminer les effets maximaux d'activation ou d'inhibition sur la repousse des tentacules des têtes d'hydres, ainsi que pour déterminer les plus faibles concentrations ayant encore une activité mesurable.

Concernant la sP, nous avions utilisé dans un premier temps le fragment sP 4-11 qui s'était révélé stimulant sur la repousse de la tête d'hydre. Cette stimulation, comparée à celle de la molécule complète sP 1-11 s'étant révélée plus forte, nous a poussés à étudier aussi les autres fragments de la molécule, ainsi que les deux antagonistes de celle-ci.

Les fragments de sP ont aussi été testés en étant appariés:

- sP 1-4 + sP 1-11; sP 1-4 + sP 4-11; sP 1-4 + sP 5-11;
- sP 1-4 + sP 6-11; sP 1-4 + sP 7-11.

HHA a été aussi testé avec les antagonistes de la sP, A1 et A2.

Les trois facteurs testés, c'est à dire, sP, HHA et Hy, tous les trois s'étant révélés actifs sur la repousse des tentacules de la tête d'hydre, le problème que nous nous sommes posé a été celui de leur action,

soit synergique soit différée dans le temps. Ainsi l'adjonction de chacune des trois molécules à deux concentrations choisies (10^{-8} M et 10^{-10} M) a été répétée après, respectivement, 2, 12 et 20 h après le début de l'expérience, soit:

- sP ajoutée avant HHA,
- sP ajoutée avant Hy,
- HHA ajoutée avant sP,
- HHA ajoutée avant Hy,
- Hy ajoutée avant sP ,
- Hy ajoutée avant HHA.

Les pourcentages de stimulation (ou d'inhibition) ont été calculés selon la formule: ± (T-C / C) x 100, où T = moyenne des tentacules des animaux traités, C = moyenne des tentacules des témoins contrôles non traités.

Résultats

L'action de la molécule sP 1-11 sur la régénération de la tête d'hydre, au vu du nombre des débuts de tentacules comptés 46 h après décapitation est montrée sur la Fig. 2.

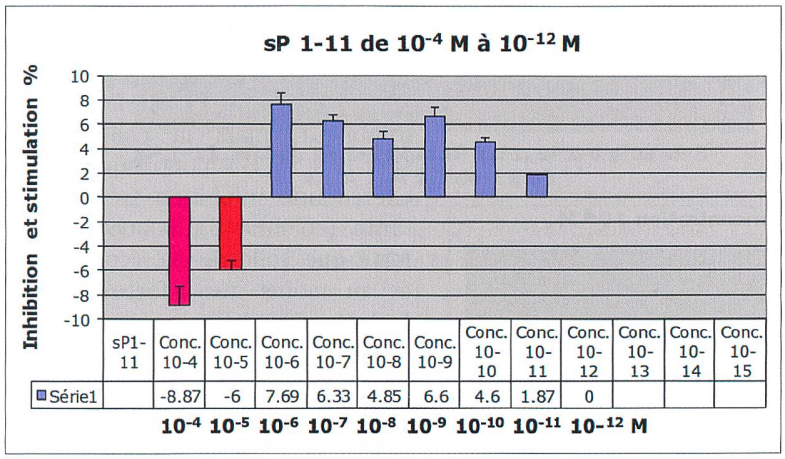

Fig. 2. Action de la molécule sP 1-11 sur la régénération de la tête d'hydre. En rouge les inhibitions aux concentrations de 10^{-4} et 10^{-5} M; en bleu les stimulations de 10^{-6} à 10^{-12} M.

Les fortes concentrations de 10^{-4} M et de 10^{-5} M donnent une inhibition qui fait place à la concentration de 10^{-6} M à une stimulation, montrant même à cette concentration son maximum. Aux concentrations successives, la stimulation décline progressivement jusqu'à 10^{-12} M où elle n'a plus d'effet mesurable.

Pour savoir si les fortes concentrations de sP 1-11 bloquaient définitivement la régénération, ces mêmes hydres ont été remises dans 20 ml d'HME, replacées dans l'incubateur et le nombre de tentacules repoussés comptés de nouveau 72 h après la décapitation.
Ces résultats sont montrés à la Fig. 3.

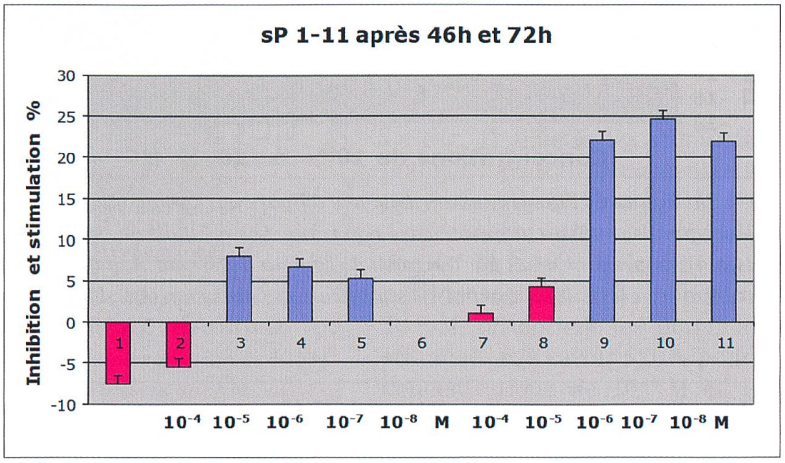

Fig. 3. Montrées inhibitrices après 46 h, les concentrations 10^{-4} et 10^{-5} M (en rouge) ne bloquent pas définitivement la régénération de la tête d'hydre puisqu'après 72 h on trouve une légère stimulation. En bleu les concentrations de sP 1-11. 10^{-6}, 10^{-7} et 10^{-8} M restent toujours stimulatrices.

La forte inhibition observée à 46 h est suivie à 72 h par une faible stimulation, montrant que l'effet de la sP 1-11 à forte concentration n'a fait que retarder le développement des régénérats.

Il devenait alors légitime de se poser la question de la nécessité ou non de la sP dans le processus de régénération de la tête d'hydre. A cet effet nous avons testé l'action de deux inhibiteurs de la sP, A1 et A2, respectivement.

Les deux inhibiteurs testés à des concentrations allant de 10^{-6} à 10^{-15} M pour A1 et de 10^{-6} à 10^{-14} M pour A2 ont freiné la régénération (Figs. 4 et 5). A1 exerce des effets inhibiteurs plus prononcés qu'A2.

Ces résultats montrent que la sP joue normalement un rôle dans la régénération de la tête d'hydre.

Des essais préliminaires nous avaient montré que la molécule incomplète de la sP, soit la séquence sP 4-11, était plus active sur la repousse de la tête d'hydre que la molécule entière sP 1-11. Cela nous a poussés à étudier l'action de diverses séquences de cette molécule. Les résultats obtenus à la concentration de 10^{-8} M sont représentés à la Fig. 6.

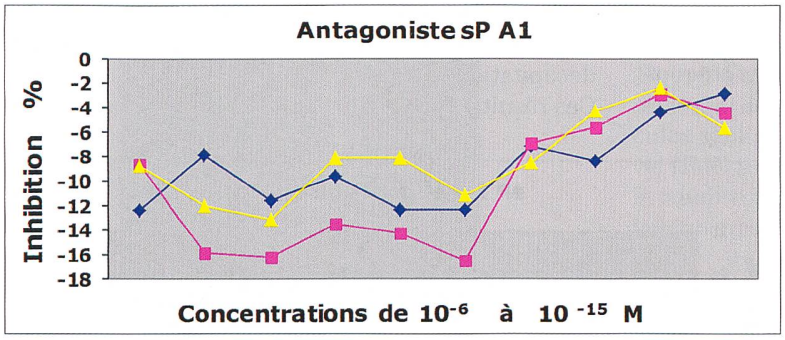

Fig. 4. Inhibition de la régénération de la tête d'Hydre par l'antagoniste A1 de la sP, donnée en % du groupe témoin non traité. Les résultats de chacun des trois groupes sont reliés par des traits de couleur différente. A toutes les concentrations les inhibitions ont été significatives (rank sum test >95 %).

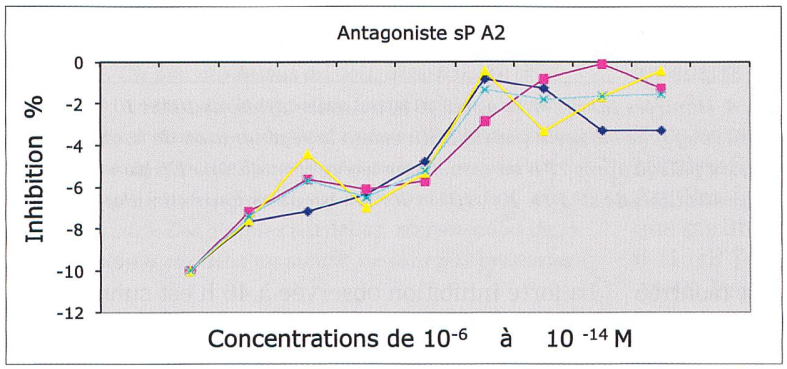

Fig. 5. Inhibition de la régénération de la tête d'Hydre par l'antagoniste A2 de la sP, en % du groupe témoin non traité. Les résultats de chacun des trois groupes sont reliés par des traits de couleur différente. Aux concentrations de 10^{-4} à 10^{-10} M les inhibitions ont été significatives (rank sum test >95 %).

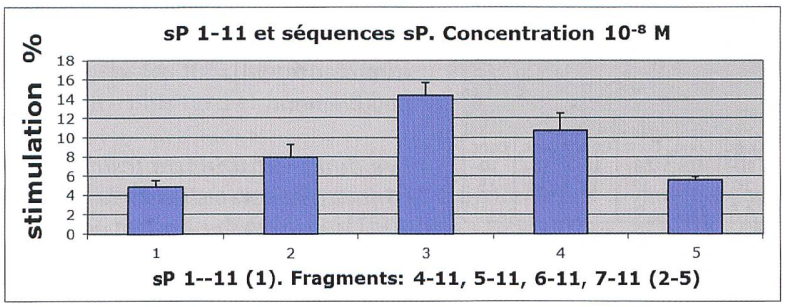

Fig. 6. Stimulation de la régénération de la tête d'Hydre par la molécule sP entière (sP 1-11, colonne 1) ou des fragments de la sP (4-11, 5-11, 6-11, et 7-11 (colonnes 2 à 5).

La stimulation mesurée pour toutes les séquences testées s'est en effet montrée supérieure à celle de sP 1-11.

Comme les séquences testées de sP se sont montrés plus stimulatrices que la sP 1-11, nous avons comparé les effets de chaque séquence sur l'antagoniste A1, ainsi que l'effet de l'adjonction de sP 1-11 à ce dernier.

Les résultats sont illustrés sur la Fig. 7.
Ces résultats montrent que A1 à la concentration de 10^{-8} M donne une inhibition de –13,5 % alors que l'adjonction de sP 1-11 contrecarre cette inhibition, mais que celle-ci reste à –7 %. En revanche les séquences sP 6-11 et sP 7-11 limitent fortement cette inhibition qui n'atteint plus que -5 %. Ces deux séquences sont d'ailleurs de puissants stimulants de la régénération quand elles sont ajoutées seules, avec près de +15 et +11 % de stimulation par rapport aux témoins non traités. Les séquences sP 7-11 et sP 1-4 ne limitent pas l'inhibition d'A1 (–12 et –11 %).

La séquence sP 1-4 n'a pas d'effet stimulant alors que les autres séquences sP sont plus actives que sP 1-11 ; nous avons testé les effets des combinaisons sP 1-11 + sP 1-4 et de sP 1-4 + sP 5-11. Les résultats sont présentés sur la Fig. 8.

Cette figure montre que sP 1-11 (colonne 1) et la combinaison sP 1-4 + sP 5-11 (colonne 4) donnent des valeurs très proches l'une de l'autre. sP 1-4 (colonne 2) est faiblement inhibiteur, mais la combinaison sP 1-11 + sP 1-4 montre que sP 1-4 exerce une inhibition très importante (colonne 3), beaucoup plus forte que celle de A2 (colonne 6) et au moins aussi forte que A1 (colonne 5).

Comparaisons entre les stimulations obtenues par HHA, sP et Hy

Nous avons vérifié l'efficacité de notre modèle en utilisant HHA, sP et Hy en comparant leurs effets. Chacune des trois molécules a été testée aux concentrations stimulant la régénération. Soulignons que pour les raisons pratiques mentionnées plus haut, la sP 4-11 a été dès lors utilisée au lieu de la sP 1-11. Les résultats apparaissent aux Figs. 9, 10 et 11, pour HHA, sP 4-11 et Hy, respectivement.
Pour HHA, les valeurs évoluent en passant de 10^{-7} M (+12 %) à 10^{-14} M. Pour le test de la sP, on a utilisé la séquence sP 4-11 (Fig. 10).

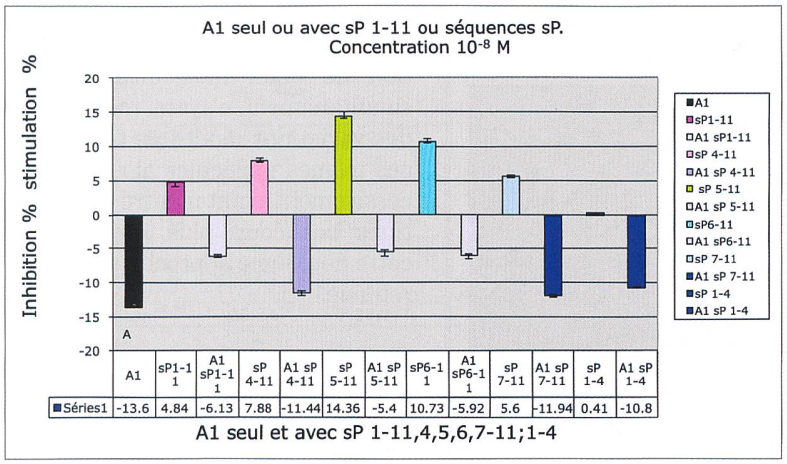

Fig. 7. Effet de l'antagoniste A1 soit seul, soit associé à la sP 1-11 soit aux fragments de la sP 4-11, 5-11, 6-11, 7-11, 1-4, tous à la concentration de 10^{-8} M. Les actions des fragments sP, en l'absence d'A1, apparaissent dans la partie supérieure du graphique. L'inhibition de la régénération de la tête d'Hydre par A1 a été visiblement diminuée par la présence de sP 1-11, 5-11 et 6-11.

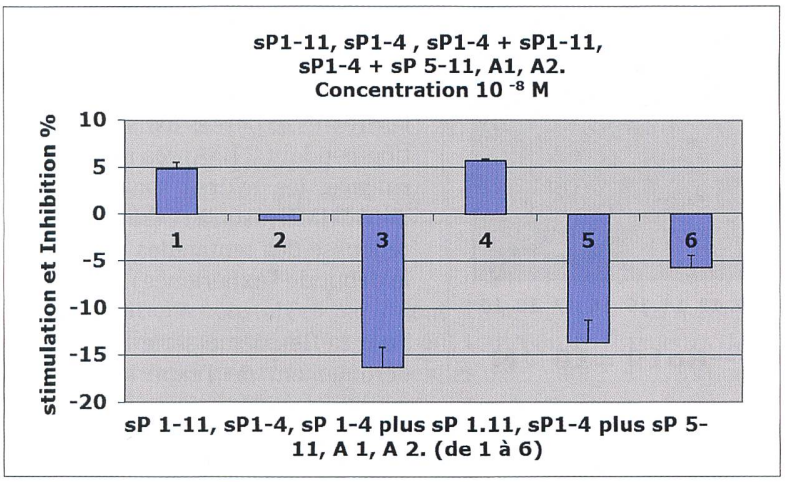

Fig. 8. Effet de la sP 1-4. SP 1-4 ajouté à sP 1-11 (colonne 3) donne une inhibition sur la régénération de la tête d'hydre du même ordre que celle donnée par A1 (colonne 5).

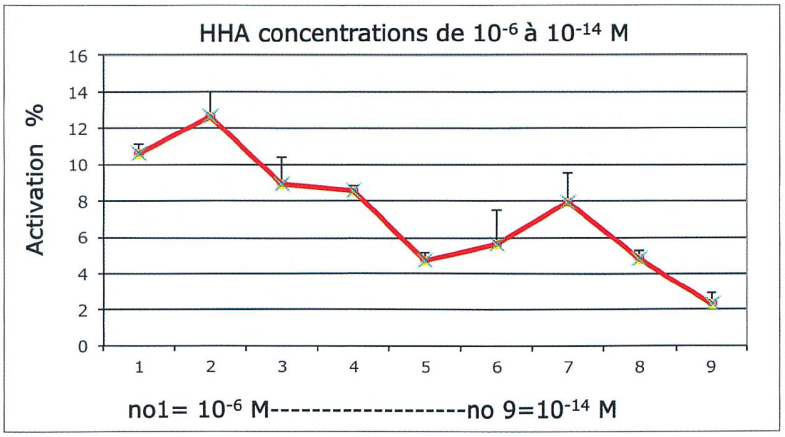

Fig. 9. Effet de la HHA (Hydra Head Activating substance) sur la régénération de la tête d'Hydre. La stimulation est nette et diminue des concentrations de 10^{-6} à 10^{-14} M.

Les stimulations de 10^{-4} M à 10^{-6} M passent de 7% à plus de 12%, puis déclinent à partir de 10^{-7} M. En l'absence des aminoacides de la séquence sP 1-3, il n'y a pas d'effet négatif aux concentrations de 10^{-4} et 10^{-5} M, contrairement à sP 1-11 (Fig. 2).

La Fig. 11 illustre les stimulations obtenues pour des concentrations d'Hy allant de 10^{-4} M à 10^{-22} M.
Aux concentrations de Hy allant de 10^{-4} M à 10^{-12} M la stimulation ne dépasse pas 15%. A partir de 10^{-12} M, on obtient les maxima de stimulation, à savoir >20% pour les concentrations de 10^{-13} M et 10^{-14} M. A 10^{-15} M la stimulation (10%) diminue graduellement pour cesser toute activité à 10^{-22} M.

Pour mieux visualiser les effets des trois molécules testées, leurs valeurs ont été comparées sur la Fig. 12.

Hy affiche une stimulation qui peut atteindre plus du double de chacune des deux autres molécules et cette stimulation maximale se produit alors que les effets des deux autres molécules sont pratiquement absents.. La stimulation observée pour HHA est généralement supérieure à celle observée pour sP 4-11. Aux concentrations de 10^{-6}, 10^{-7} et 10^{-8} M, les réponses des trois molécules sont proches. A 10^{-14} M la stimulation exercée par Hy est de 10% et contrairement à HHA ou à sP elle exerce des stimulations mesurables jusqu' à de très faibles concentrations.

Action réciproque des molécules actives

Puisque les trois molécules testées isolément, soit HHA, sP et Hy ont montré une action stimulante sur la régénération de la tête d'hydre, il a paru intéressant d'étudier leur action en les ajoutant en combinaison soit simultanément, soit en différé. Deux concentrations ont été choisies, à savoir 10^{-8} et 10^{-10} M, car les trois molécules ont montré une

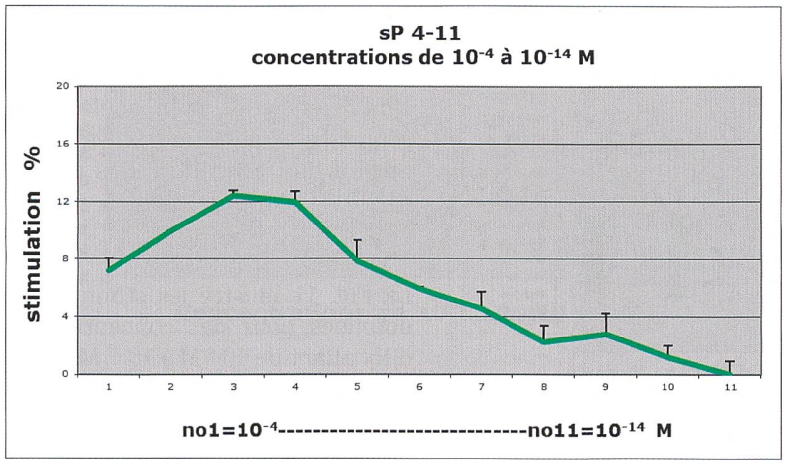

Fig. 10. Effet du fragment sP 4-11 sur la régénération de la tête d'Hydre. La stimulation maximale à 10^{-4} et 10^{-5} M diminue ensuite et cesse à 10^{-14} M.

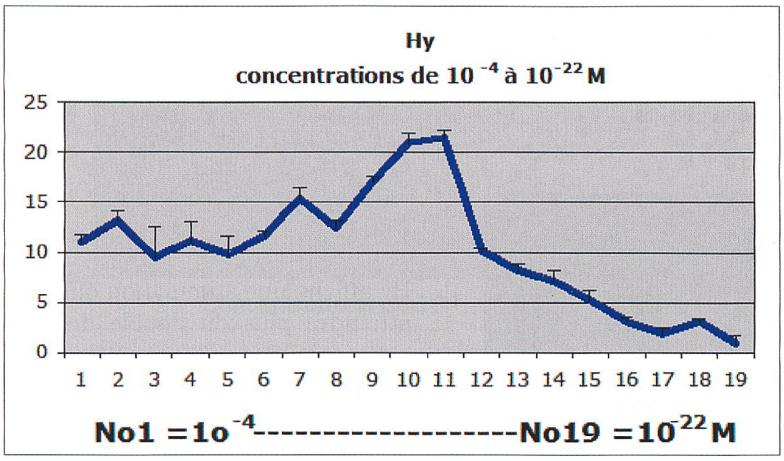

Fig. 11. Effet de l'Hy (Hypoxanthine) sur la régénération de la tête d'Hydre. Une stimulation très nette est observée dès la concentration de 10^{-4} M, elle devient maximale à 10^{-13} et 10^{-14} M, pour diminuer ensuite et ne cesser qu'après 10^{-21} M.

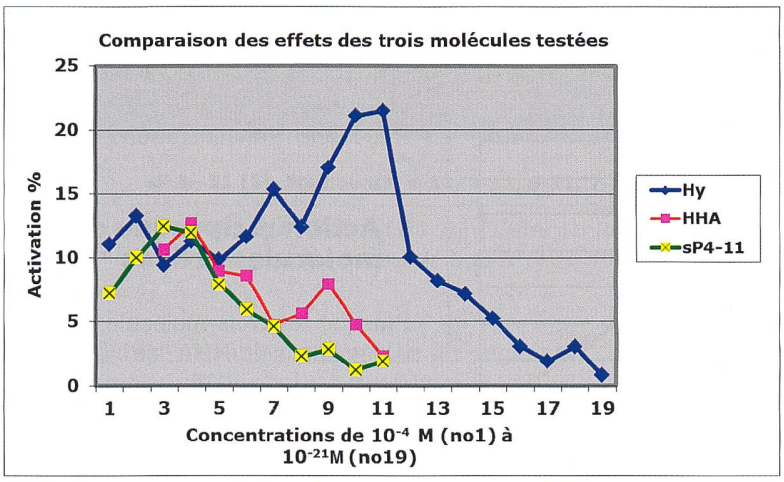

Fig. 12. La comparaison des effets de HHA, sP 4-11 et Hy sur la régénération de la tête d'Hydre montre des stimulations d'intensité différente. L'effet d'Hy est maximal à 10^{-13} et 10^{-14} M alors que les effets de HHA et sP4-11 ne sont plus décelables.

stimulation à ces concentrations. L'observation préliminaire de l'action de deux molécules ajoutées simultanément n'ayant montré que des variations modestes tandis que ces mêmes molécules ajoutées successivement ayant montré des variations beaucoup plus importantes, cette deuxième approche a donc été retenue.

Chaque expérience s'est déroulée dans les conditions standard décrites précédemment (HME 17 °C) incluant trois groupes d'hydres témoins pour chaque trois groupes de 27 à 30 hydres traitées.

Dans la première série de tests, les hydres décapitées sont incubées pendant 2 h dans la solution contenant la première molécule, puis, après rinçage, la solution contenant la deuxième molécule est ajoutée et les hydres exposées dans cette solution pendant 2 h. Après un nouveau rinçage, les hydres sont exposées dans l'HME jusqu'à l'évaluation de la repousse des tentacules (46 h après le début de l'expérience).

Pour la deuxième série de tests, le déroulement de l'expérience a été modifié pour des raisons pratiques. Les hydres décapitées continuent à être exposées à la première molécule active pendant 5 h 30, puis elles ont été rincées et incubées dans l'HME à 17°C. Ensuite, soit 12 h ou 20 h après le rinçage la deuxième molécule active est ajoutée et les hydres incubées dans ce milieu jusqu'à l'évaluation du nombre de tentacules repoussées (entre 46 et 48 h après le début de l'expérience). L'ensemble des résultats est présenté à la Table 1.

Les mêmes résultats sont montrés ci-dessous sous forme graphique, sans les écarts-types, la statistique appliquée donnant les probabilités par le test de comparaison de pourcentage-χ^2 des valeurs mesurées.

La Fig. 13 montre les résultats obtenus pour les ajouts à 2 h d'intervalle.

	Concentration 10^{-8} M				Concentration 10^{-10} M	
	2h	12h	20h		2h	12h
HHA $8.94^{\pm 1.5}$	plus HHA			**HHA** $4.66^{\pm 0.59}$	plus HHA	
	$14.04^{\pm 0.7}$	$24.5^{\pm 1.8}$	$20.95^{\pm 2.96}$		$9.11^{\pm 1.42}$	$22.22^{\pm 1.67}$
	plus sP 4-11				plus sP 4-11	
	$36.5^{\pm 5.2}$	$27.1^{\pm 2.8}$	$24.16^{\pm 2.51}$		$12.08^{\pm 2.46}$	$19.54^{\pm 2.14}$
	plus Hy				plus Hy	
	$9.6^{\pm 0.99}$	$20.34^{\pm 0.89}$	$7.88^{\pm 0.39}$		$15.65^{\pm 1.42}$	$13.71^{\pm 0.51}$
sP 4-11 $7.88^{\pm 1.45}$	plus sP 4-11			**sP 4-11** $4.54^{\pm 1.35}$	plus sP 4-11	
	$10.84^{\pm 1.13}$	$22.25^{\pm 1.4}$	$11.6^{\pm 0.47}$		$7.85^{\pm 1.52}$	$7.68^{\pm 0.94}$
	plus HHA				plus HHA	
	$23^{\pm 3.18}$	$34.1^{\pm 1.49}$	$30.8^{\pm 0.61}$		$7.58^{\pm 0.85}$	$18.26^{\pm 2.9}$
	Plus Hy				plus Hy	
	$10.23^{\pm 0.30}$	$30.79^{\pm 2.29}$	$17.15^{\pm 1.18}$		$13,84^{\pm 1.28}$	$19.5^{\pm 7.4}$
Hy $9.81^{\pm 2.2}$	plus Hy			**Hy** $15.31^{\pm 1.49}$	plus Hy	
	$19.79^{\pm 2.9}$	$15.44^{\pm 0.63}$	$11.23^{\pm 1.88}$		$20.43^{\pm 1.03}$	$12.68^{\pm 1.93}$
	plus sP 4-11				plus sP 4-11	
	$18.42^{\pm 1.47}$	$36.15^{\pm 2.47}$	$20.55^{\pm 2.62}$		$20.01^{\pm 1.49}$	$18.17^{\pm 0.10}$
	plus HHA				plus HHA	
	$18.2^{\pm 0,16}$	$28.17^{\pm 2.8}$	$18.58^{\pm 2.07}$		$24.15^{\pm 3.18}$	$17.34^{\pm 1.88}$

Table 1. Action combinées de HHA, sP4-11 et Hy sur la régénération de la tête d'Hydre. Les deux colonnes surmontées d'une marque bleue donnent les pourcentages de stimulation des trois molécules testées seules. Les pourcentages de stimulation résultant des additions de deux molécules sont surmontés d'une marque grise. Les écarts-types entre les moyennes de trois groupes testés sont mis en exposant.

Notons que pour HHA + Hy, sP 4-11 + Hy, Hy + HHA, comme dans tous les groupes Hy, les valeurs obtenues pour la concentration de 10^{-10} M sont plus élevées que celles observées pour la concentration de 10^{-8} M.
Hy ajoutée après 2 h montre que :

1) La valeur de HHA + Hy à 10^{-8} M n'est pas significativement différente de la valeur obtenue avec HHA seule à 10^{-8} M. À la concentration de 10^{-10} M, la valeur de HHA + Hy est significativement plus stimulante que HHA 10^{-10} M seule ($P < 0.05$).

Les stimulations constatées par l'ajout d'une molécule, soit identique, soit différente, sont toutes augmentées par rapport aux valeurs obtenues par l'ajout d'une seule molécule initiale.
Les valeurs élevées sont obtenues lorsque HHA est présente, soit :
HHA + sP 4-11, sP 4-11 + HHA, Hy + HHA.

La même observation est valable aussi pour les valeurs de sP suivie de Hy.

2) Lorsque le premier facteur ajouté est Hy, les valeurs obtenues à 10^{-8} M sont significativement augmentées par rapport aux valeurs de HHA, sP 4-11 ou Hy mises seules ($P < 0.01$ et < 0.001).

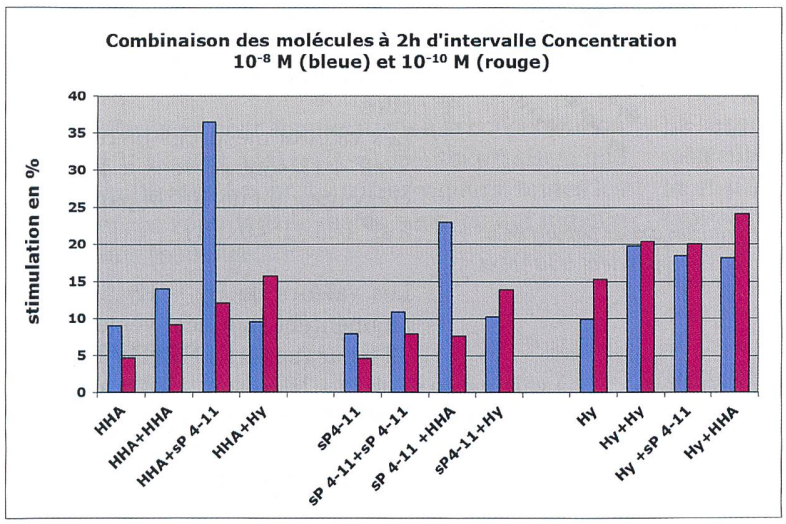

Fig. 13. Régénérations des têtes d'Hydre obtenues pour les ajouts combinés sP 4-11, HHA et Hy, à 2 h d'intervalle. Les histogrammes bleus correspondent à 10^{-8} M et les rouges à 10^{-10} M.

Il faut encore remarquer que Hy + Hy, Hy+ sP 4-11 et Hy + HHA ont des valeurs proches les unes des autres et sont significativement augmentées par rapport aux valeurs d'Hy seule à la concentration de 10^{-8} M ($P<0.05$), mais non à 10^{-10} M.

Les résultats observés après 12 h sont présentés à la Fig. 14.
Il ressort de l'observation de ce graphique que les valeurs observées à 10^{-8} M sont plus élevées que celles obtenues à 10^{-10} M, sauf pour Hy.

Après 12 h la valeur de Hy + Hy est plus élevée à 10^{-8} M qu'à 10^{-10} M. Il y a, à l'évidence synergie entre les facteurs. La stimulation maximale est observée par Hy + sP 4-11 qui a, à 10^{-8} M, 35% de stimu-

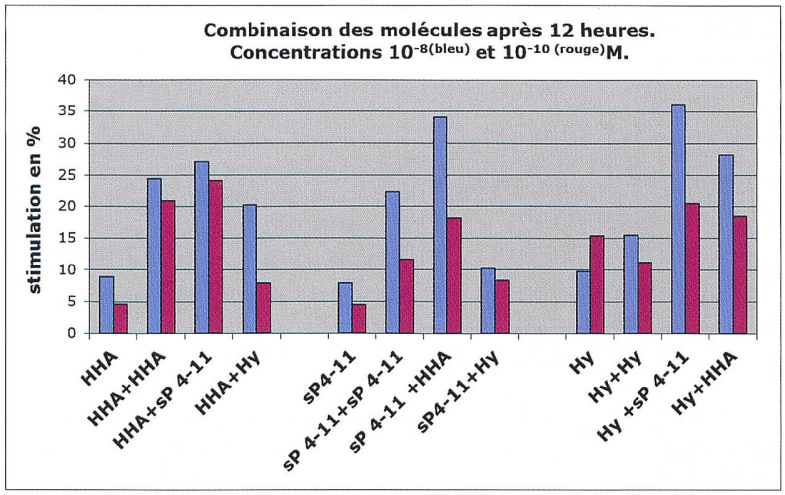

Fig. 14. Régénérations des têtes d'Hydre obtenues pour les ajouts combinés sP 4-11, HHA et Hy, après 12h. Les histogrammes bleus correspondent à 10^{-8} M et les rouges à 10^{-10} M.

- 2) les valeurs obtenues pour HHA +Hy ne sont pas augmentées à 10^{-8} M mais le sont significativement à 10^{-10} M par rapport à HHA ($P < 0.05$).

- 3) Lorsque sP 4-11 est ajouté en premier, les valeurs de SP 4-11 + HHA sont significativement plus élevées que celles de sP 4-11, aux deux concentrations ($P < 0.001$). Les valeurs de SP 4-11 + Hy sont plus élevées que celles de sP 4-11 à 10^{-8} et 10^{-10} M, mais non significativement.

- 4) Si Hy est ajouté en premier, les valeurs de Hy + sP 4-11 à 10^{-8} M sont significativement plus élevées ($P< 0.05$) que pour Hy +Hy ou Hy .

lation, soit $P < 0.001$, par rapport à Hy, sP 4-11 ou HHA. Enfin, Hy+ HHA, a 28% de stimulation, soit $P< 0.001$, par rapport à Hy, SP 4-11 ou HHA.

La Fig. 15 montre les résultats obtenus après un délai de 20 h.

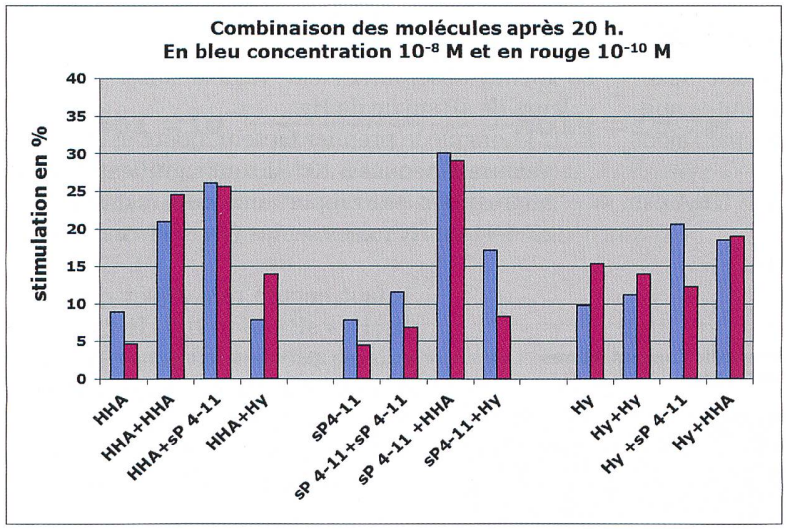

Fig. 15. Régénérations des têtes d'Hydre obtenues pour les ajouts combinés sP 4-11, HHA et Hy, après 20h. Les histogrammes bleus correspondent à 10^{-8} M et les rouges à 10^{-10} M.

Après 20 h pour HHA + Hy les valeurs sont plus élevées à la concentration de 10^{-10} qu'à 10^{-8} M de même que pour HHA + HHA, Hy, Hy +Hy.

- 1) Dans le groupe où HHA est ajouté en premier, les valeurs de HHA + HHA, HHA + sP 4-11, aux deux concentrations, sont significativement plus élevées ($P <0.05$ et 0.001 respectivement) que pour HHA seule, tandis que

Dans les trois séries de tests effectués après 2, 12 et 20 h et dans chacun des groupes, l'observation des additions moléculaires montre des effets additifs sur la stimulation. Cela ressort des Figs. 13, 14 et 15.

Les conditions des tests étant semblables dans les séries de 12 h et 20 h, les modifications observées entre les résultats des molécules testées sont associées à ces temps.

Ainsi après 12 h et 20 h les valeurs de HHA + HHA, à 10^{-8} M, sont plus élevées à 12 h ($P <0.01$) aussi bien qu'à 20 h ($P<0.05$) par rapport à HHA; il en va de même pour la concentration de 10^{-10} M ($P <0.001$). Observons que les valeurs obtenues à 10^{-8} ou à 10^{-10} M à 12 h et 20 h ne sont pas significativement différentes entre elles.
Les valeurs mesurées pour sP 4-11 + sP 4-11 sont élevées à 12 h à la concentration de 10^{-8} M par rapport à sP 4-11 ($P <0.001$).

Les valeurs de Hy + Hy à 10^{-8} M augmentent significativement après 12 h par rapport à Hy ($P <0. 05$).
Les valeurs de sP 4-11 + HHA sont à 12 h à 30% de stimulation à 10^{-8} M ($P <0.01$) et à moins de 20% à 10^{-10} M. Après 20 h, ces valeurs sont égales à près de 30% pour les deux concentrations.

Pour HHA + HHA et HHA + sP 4-11, après 12 h. les valeurs à 10^{-10} M (20%), sont moins élevées que celles quantifiées à 10^{-8} M (25%). Quantifiées après

20 h, cette tendance semble s'inverser: HHA + HHA passant de 25% à 20% et HHA + sP 4-11 de 20 à 25% de stimulation.

Après 20 h la combinaison de Hy + Hy n'a presque plus d'effet tandis que les valeurs de la combinaison Hy + sP 4-11 restent à 10^{-8} M à 20% de stimulation et de 15% à 10^{-10} M contre 20%. pour Hy + HHA .

Enfin, aux deux concentrations testées, les valeurs de HHA + Hy sont plus faibles que celles de Hy + HHA (Fig. 16).

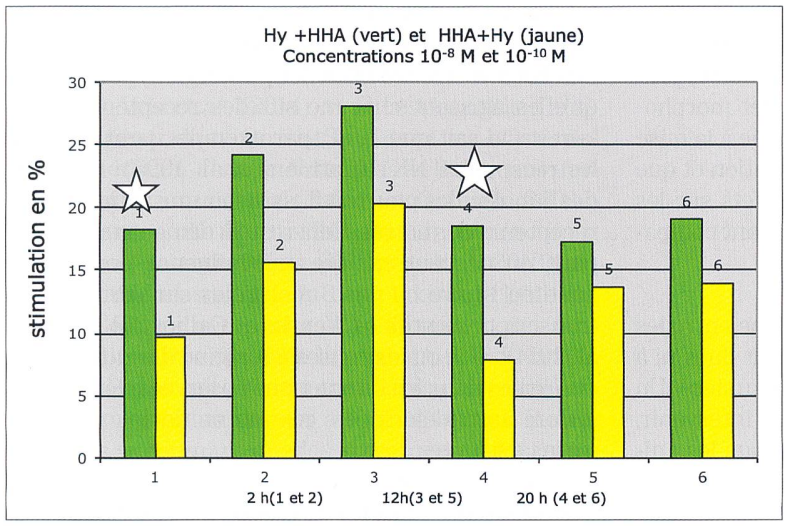

Fig. 16. Effet sur la régénération de la tête d'Hydre de combinaisons successives de Hy puis HHA (vert) et HHA puis Hy (jaune) à 2, 12 et 20h. Les étoiles montrent des différences statistiquement significatives à la concentration de 10^{-8} M à 2 et à 20h ($P < 0.05$).

Hy ajouté avant HHA conditionne apparemment les tissus à l'action subséquente de HHA, tandis que l'inverse ne se vérifie pas, ceci aux deux concentrations testées (colonnes 1, 3, 4 pour 10^{-8} et colonnes 2, 5, 6, pour 10^{-10} M).

Ces différences sont significatives à la concentration de 10^{-8} M à 2 h et à 20 h (P <0,05, étoile*). Bien que non significatives pour les autres valeurs, toutes les différences vont dans le même sens, ce qui indique une vraie tendance.

Discussion

La première partie consacrée à la sP a permis d'une part, de démontrer l'action de ce neuropeptide dans la régénération de la tête d'hydre et, d'autre part de préciser l'importance de ses diverses séquences. La sP est présente chez pratiquement tous les animaux chez qui elle a été recherchée, y compris chez l'homme (Skrabanek et Powell 1978; Constandanidis et al. 1980; Skrabanek et Powell 1980; Taban et Cathieni M. 1983, 2002). Nos résultats montrent qu'aux concentrations de 10^{-4} M et 10^{-5} M, elle a freiné la régénération de la tête d'hydre, mais elle a manifestement exercé des effets stimulant aux concentrations de 10^{-6} à 10^{-11} M.

Les effets des deux antagonistes A1 et A2 soulignent l'implication de la sP dans la régénération de la tête d'hydre. Il est intéressant de noter que si sP 1-4 est faiblement inhibiteur, cette inhibition devient plus marquée lors de la combinaison de sP 1-11 avec sP 1-4.

Ce sont les acides aminés Gln-Gln (glutamine) présents dans les séquences sP 6-11 et sP 7-11 qui ont permis de contrebalancer à environ 50% l'effet de A1, tout comme l'avait fait sP 1-11. La glutamine paraît donc jouer un rôle majeur dans la stimulation provoquée par la sP 1-11 chez l'hydre, alors que les acides aminés ARG, PRO, LYS de sP 1-4 sont responsables de l'effet inhibant la régénération et que la seconde proline, présente dans sP 4-11 ne participe apparemment plus à cet effet.

Dans la seconde partie, l'action de l'hydra-head-activating substance décrite par Schaller (1973a et b) et Schaller et Bodenmüller (1981) a été clairement confirmée. Sa spécificité la rend probablement limitante de l'action stimulatrice exercée par Hy, mais non de celle due à sP 4-11. Il y a donc une nette différence entre les actions des trois molécules, même si HHA, sP 4-11 et Hy ont tous trois en commun d'exercer des effets stimulants marqués. Les différences se retrouvent dans les résultats des ajouts pratiqués après 2, 12 ou 20 h aux concentrations de 10^{-8} et 10^{-10} M.

La surprise est venue de l'hypoxanthine (Hy). Cette molécule que nous avions isolée d'*Hydra attenuata* et d'*Actinia equina* en cherchant un facteur de croissance encore inconnu est un produit du métabolisme des acides nucléiques. La Fig. 12 montre que Hy est en effet un facteur de croissance actif à des concentrations beaucoup plus faibles que celles de sP 1-11 ou HHA, Hy conservant une activité stimulante jusqu'à près de 10^{-22} M, alors que HHA et sP 1-11 sont inactifs en dessous de 10^{-13} M.

Hy est certainement relâchée lors de la dégradation des acides nucléiques des cellules altérées lors de l'amputation. Elle est ainsi devenue disponible pour la synthèse de l'ADN et donc pour les mitoses nécessaires à la régénération. Comme elle agit à de

très faibles concentrations, Hy apparaît donc comme un stimulant possiblement primaire qui agit sur les autres molécules qui participent à la régénération. Galliot (2011) et Chera et al. (2009, 2011) ont bien montré que les cellules lésées lors de l'amputation émettent des signaux moléculaires, autres que Hy, qui vont mobiliser les cellules disponibles pour permettre la régénération de l'hydre. Ces mobilisations se retrouvent chez de nombreux autres animaux (Galliot 2011). L'Hy participe à cette mobilisation. Elle stimule la formation des valeurs mesurées après l'action de HHA, mais à l'inverse ces valeurs sont moindres si HHA est ajoutée avant Hy. HHA ne limite pas de la même manière les stimulations des valeurs mesurées après sP 4-11. Ces différences pourraient être dues au fait que sP et Hy ont des actions générales, probablement mitogènes. HHA ayant un effet morphogène, il est possible que son activité soit liée à la mise en place des cellules en voie de différenciation et que cette activité soit en relation avec ses effets sur les valeurs de Hy. Les résultats présentés ici sont compatibles avec cette hypothèse.

Les variations relevées dans les écarts-type entre les différentes moyennes de la Table 1 ne sont dues ni à la nourriture, ni à la température, ni à la lumière. Un ou d'autres facteurs non identifiés ont du intervenir, sans effet toutefois sur les résultats, puisque les animaux traités ont été comparés aux témoins non traités observés simultanément.

Nos résultats s'intègrent dans les implications nombreuses et complexes qui conduisent à la néoformation, ici des premières marques de la régénération de la tête d'hydre.

Les plans de ces structures se trouvent dans les gènes, mais comme pour les territoires de régénération chez le triton, la mise en œuvre de ces plans est commandée par le niveau périphérique atteint, ce niveau de lecture du génome pouvant être modifié, chez le triton, par l'acide rétinoïque (Niazi et al. 1985).

L'application de ces plans délicats demande l'intervention de plusieurs molécules, dont les neurotransmetteurs. Chez le triton, l'inhibition de l'un d'eux suffit à bloquer ou freiner la régénération de la patte, ainsi l'alpha-méthyl-p-tyrosine qui empêche l'action des catécholamines limite, de ce fait, la régénération (Taban et al. 1976), comme par analogie, ici, A1 et A2 limitent la régénération chez l'hydre.

Nos résultats démontrent de plus que les trois molécules sont interactives. Chacune agit sur l'effet mesuré de l'autre. Comme l'édification du régénérat, en trois dimensions, reste naturellement d'une grande complexité, nos résultats illustrent une facette des moyens mis en œuvre. Ils s'inscrivent dans la quête des mécanismes impliqués. Galliot a mentionné que la régénération de la tête d'hydre demande des morts cellulaires et une nouvelle neurogénèse (Galliot 2013 ; Vriz et al. 2014). Or la sP est un neurotransmetteur. D'autres neurotransmetteurs existent chez *Hydra attenuata*, comme les catécholamines ou la sérotonine. Dosés chez l'hydre, ceux-ci ont montré des variations journalières et saisonnières (résultats non publiés). Or nous savons que les catécholamines interviennent dans la régénération chez le triton (Taban et al 1978a, 1978b ; Taban et Cathieni 1989).

Les mesures des effets réciproques des trois molécules montrent l'importance des temps d'application de chacune d'entre elles. La première hypothèse est qu'elles agissent chacune sur des récepteurs cellulaires. On sait que la sP, par exemple, peut agir sur les récepteurs NK1 (Cathieni et al. 1995). Chacune des 3 molécules pourrait aussi avoir une action sur les récepteurs des autres. Cela reste à démontrer. D'autre part, on ne peut exclure une influence possible de l'une ou l'autre ou des 3 molécules sur certains des transcripts identifiés (Wenger et Galliot 2013 ; Vriz et al. 2014). Si la ou les causes à l'origine des différences observées dans les interactions observées demandent encore à être élucidées, ces interactions sont néanmoins évidentes.

Les tentacules mesurés se trouvent à l'extrémité distale de la tête d'hydre et apparaissent comme les premiers témoins de la formation du régénérat. Pour certains cette néoformation primaire révèlerait une « dominance distale » (Shuraleff et Thornton 1967). Chez le triton, par exemple, lorsqu'un bourgeon de régénération après amputation de la patte est de petite taille, seuls un ou deux doigts sont formés au lieu du membre entier (Guyénot et Schotté 1923).

La connaissance des gènes HOX indique que les structures et fonctions animales sont programmées (Duboule 1989 ; Sordino et al. 1995 ; Di Poï et al. 2010). Ces programmes tiennent compte, lors de la régénération, des éléments existants. N'est régénéré que ce qui a été détruit, enlevé. La présence des tissus ou membres, même morts mais en place, prévient toute régénération. Ce sont les parties de l'animal restantes après amputation qui indiquent au génome ce qui doit être reconstitué. La nature de ces informations reste à trouver.

Conclusions

Les capacités régénératives de l'Hydre ont été décrites en 1774 par Trembley (Trembley 1774). Elles font partie des réparations que la nature applique après les traumatismes.

Ce mémoire montre les effets et les effets réciproques de trois molécules, HHA, sP et Hy dont la présence chez l'hydre a été démontrée précédemment pour les deux premières et dans ce mémoire pour Hy.

La génétique et l'épigénétique donneront sans doute les éléments cellulaires mobilisés par ces trois molécules ainsi que sur ceux qui les ont mobilisés. Le fait que Hy se soit révélée un facteur important de stimulation de la régénération de la tête d'hydre mérite d'être relevé. La stratégie de la nature a été d'utiliser ici un produit probablement relâché par les cellules lésées, pour activer la réparation. Les cellules endommagées par un traumatisme et mourantes envoient des signaux, comme l'ont montré Galliot (2013) et Vriz et al. (2014), et Hy est capable d'activer la régénération. On sait que dans les blastèmes de régénération chez le triton, les cellules sont fortement interconnectées (Taban et Cathieni 2002) permettant ainsi de nombreuses inter-réactions. Le nombre de transcripts (Wenger et al. 2013) est considérable et souligne la complexité de l'édification des étapes nécessaires à la formation des tentacules, première étape de la régénération de la tête d'hydre. Par la suite ces tentacules vont repérer, saisir les proies et les amener à l'orifice buccal. Il n'est donc pas surprenant que les structures et fonctions requises nécessitent une mise en place complexe.

Remerciements

Les auteurs remercient tous ceux qui ont permis cette recherche. Mr R. Tièche qui a conçu l'appareil permettant des températures et luminosités contrôlées, le laboratoire du Prof. R. Offord qui a permis la détermination de Hy, le service de psychiatrie qui a abrité et soutenu le laboratoire de neurobiologie, feu le Prof. M. Da Prada, d'Hoffmann-La Roche qui a dosé les catécholamines et la sérotonine des hydres prélevées à diverses heures du jour et à divers mois de l'année, le Prof. M. Schorderet qui a revu le manuscrit, le Dr. R. Degli Agosti pour son aide précieuse dans la préparation du manuscrit final.

Bibliographie

- **Cathieni M, Taban C, Mastrangelo D.** 1995. Pharmacological evidence that gold-protein-substance P complex activates neurokinin NK1 receptors. Cell Physiol. Biochem. 5 : 85-95.
- **Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, Martinou JC, Galliot B.** 2009. Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. Dev. Cell, 17 : 279-289.
- **Chera S, Ghila L, Wenger Y, Galliot B.** 2011. Injury induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis induced compensatory proliferation in Hydra head regeneration. Dev. Growth Differ. 53 : 186-201.
- **Constantinidis J, Taban C, Guntern R, Tissot R.** 1980. Etude morphologique de la substance P dans le cerveau humain, par immuno-histo-fluorescence. Schweiz. Arch. Neurol. 127 : 323-355.
- **Di-Poï N, Montoya-Burgos J, Miller H, Pourquie O, Milinkovitch M, Duboule D.** 2010. Changes in *Hox* genes 'structure and function during the evolution of the squamate body plan. Nature, 464 : 99-103.
- **Duboule D.** 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. EMBO J. 8 : 1497-1505.
- **Galliot B.** 2011. Entre homéostasie et développement, quelles stratégies pour régénérer ? Biologie aujourd'hui, 205 : 125-137.
- **Galliot B.** 2013. Injury induced asymmetric cell death as a driving force for head regeneration in Hydra. Dev. Genes Evol. 223 : 39-52.
- **Guyénot E, Schotté O.** 1923. Relation entre la masse du bourgeon et la morphologie du régénérat. C.R. Soc. Biol. 89 : 491.
- **Lehnhoff HM.** 1983. Hydra Research Methods. Plenum Press. New-York and London.
- **Niazi IA, Pescitelli MJ, Stocum DL.** 1985. Stage-dependent effects of rétinoïc acid on regenerating urodele limbs. Roux Arch. Dev. Biol. 194 : 355-363.
- **Schaller C.** 1973a. Isolation and characterization of a low- molecular-weight substance activating head and bud formation in hydra. J. Embryol. exp. Morph. 29 : 27-38.
- **Schaller C.** 1973b. Distribution of the head-activating substance in hydra and its localization in membranous particles in nerve cells. J. Embryol. exp. Morph. 29 : 39-52.
- **Schaller C, Bodenmüller H.** 1981. Isolation and amino acid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 7000-7004. **with a correction in 79 : 1336.**
- **Shuraleff NC, Thornton CS.** 1967. Analysis of distal dominance in the regenerating limb of the axolotl. Experientia, 23 : 747-748.
- **Skrabanek P, Powell D.** 1978. Substance P Annual Research Revue. Vol. 1. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- **Skrabanek P, Powell D.** 1980. Substance P Annual Research Revue. Vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- **Sordino P, Van der Hoeven F, Duboule D.** 1995. Hox gene expression in fins and the origin of vertebrate digits. Nature, 375 : 678-681.
- **Taban C, Cathieni M.** 1978a. Localization of Substance P-like immunoreactivity in Hydra. Experientia, 35 : 811-812.
- **Taban C, Cathieni M.** 1978b. Stimulation of Hydra Head Regeneration by Substance P. Experientia, 34 : 958.
- **Taban C, Cathieni M, Constantinidis J.** 1976. Production of retarded, albino, regenerates in newts by alpha-methyl-p-tyrosine. J. Exp. Zool. 197 : 423-427.
- **Taban C, Cathieni M, Guntern R, Constantinidis J.** 1978a. Histofluorescence of Monoamines in Newt Forelimb Regenerates. Roux Arch. Dev. Biol. 185 : 79-94.
- **Taban C, Cathieni M, Schorderet M.** 1978b. Cyclic AMP and noradrenaline sensitivity fluctuations in regenerating newt tissue. Nature, 271 : 470-472.
- **Taban C, Cathieni M.** 1983. Distribution of Substance P-like immunoreactivity in the brain of the newt (*Triturus cristatus*). J. Comp. Neurol., 216 : 453-470.
- **Taban C, Cathieni M.** 1989. Second messengers in Newt limb regeneration. cAMP and cGMP levels and distribution. *In* : V. Kiortsis S. Kossoulakos, H. Wallace (eds.). Recent Trends in Regeneration, Plenum Publishing Corporation. p 97-105.
- **Taban C, Cathieni M.** 2002. Cell interconnections in the amphibian Newt as shown by gold-protein ligand complex (GPL) marking in the newt limb and limb regenerates. Proceedings of the Georgian Academy of Sciences. Biological Series A, 28 : 71-79.
- **Trembley A.** 1774. Mémoires, pour servir à l'histoire d'un genre de polype d'eau douce. A Leide : Chez Jean & Herman Verbeek.
- **Vriz S, Reiter S, Galliot B.** 2014. Cell death : a program to regenerate. Curr. Top. Dev. Biol. 108 :121-151.
- **Wenger Y, Galliot B.** 2013. RNAseq versus genome-predicted transcriptomes : a large population of novel transcripts identified in an illumina-454 Hydra transcriptome. Dev. Genes Evol. 223 : 39-52.