
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Orloff, S. (1969). *Contribution à l'étude de l'ostéolathyrisme* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté de Médecine – Médecine, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/215107/1/72322623-c51a-4afb-b742-ef11f3465ddc.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- English Version -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

FACULTÉ DE MÉDECINE
LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE
PROF. P .P. LAMBERT
FONDATION MÉDICALE REINE ÉLISABETH

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'OSTÉOLATHYRISME

PAR

S. ORLOFF



THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU GRADE D'AGRÉGÉ DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ÉDITIONS ARSCIA S.A.

BRUXELLES

1969

TH 126

THÈSES ANNEXES

Le test au latex sur lame est sans valeur en tant qu'épreuve de diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde : le test de fixation au latex pratiqué sur des dilutions successives de sérum ou les tests dérivés de ce dernier doivent lui être substitués dans ce but.

La biopsie rectale dans la polyarthrite chronique évolutive non traitée aux sels d'or n'a qu'une valeur limitée dans le diagnostic précoce de l'amyloïdose. La recherche de l'albuminurie lui est supérieure.

L'hydroxyprolinurie totale est un moyen de détection simple, fidèle des remaniements du tissu de soutien. Son usage dans la polyarthrite rhumatoïde permet de caractériser les poussées évolutives.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE
DE L'OSTÉOLATHYRISME

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

FACULTÉ DE MÉDECINE
LABORATOIRE DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE

PROF. P. P. LAMBERT
FONDATION MÉDICALE REINE ÉLISABETH

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'OSTÉOLATHYRISME

PAR

S. ORLOFF

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU GRADE D'AGRÉGÉ DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ÉDITIONS ARSCIA S.A.
60, RUE DE L'ÉTUVE — BRUXELLES
1969

*Tous droits de traduction,
d'adaptation et de reproduction
par tous procédés, y compris la
photographie et les microfilms,
réservés pour tous pays.*

© 1969 by ÉDITIONS ARSCIA S.A.

D. 1969/0227/15

(Printed in Belgium)

Le présent travail n'aurait pas été entrepris sans l'attention et les encouragements des Professeurs P. GOVAERTS et W. BAUER ; si l'auteur n'avait pas été conscient de la portée limitée de cet ouvrage et de ses imperfections il aurait souhaité en faire hommage à la mémoire de ces deux maîtres.

Le Professeur J. GROSS a été le chef d'équipe à l'esprit toujours aux aguets, généreux, exigeant, sans lequel aucune œuvre de longue haleine ne peut être menée à bien.

Le Professeur P. P. LAMBERT par sa compréhension et son hospitalité a permis que se continuent dans son laboratoire de Médecine Expérimentale des recherches pourtant fort éloignées de la plupart de ses propres centres d'intérêt. Ses encouragements ont été déterminants dans la poursuite et l'achèvement de ce travail.

Le Professeur P. SPHEL, à la Fondation Reine Elisabeth, a partagé avec le Professeur LAMBERT le rôle d'hôte amène et généreux. Tous les collaborateurs académiques, techniques et administratifs de ces maîtres ont été à leur image aimables, attentifs et serviables.

Les Professeurs A. VERNIORY et L. MARTIN ainsi que le Docteur P. VEREERSTRAETEN ont soustrait des heures précieuses à leurs activités afin de discuter longuement de ce travail.

L'auteur voudrait exprimer à tous sa profonde gratitude.

Les Fondations H. Hay Whitney (New York), Lekime et Govaerts (Bruxelles) n'ont pas ménagé leur appui tant durant le séjour de l'auteur à l'Ecole de Médecine de l'Université de Harvard qu'à son retour à la Faculté de Médecine de l'U.L.B. ; leur aide matérielle lui a permis de se consacrer au travail de recherche pendant plusieurs années.

L'auteur tient également à remercier le Docteur C. PIRSON dont l'appui lui a permis de faire réaliser l'impression de cette thèse par les Editions Arsacia.

S. ORLOFF,
*Hospitalisation de Rhumatologie
Clinique Physiothérapique
Prof. E. COLINET,
Hôpital Universitaire Brugmann*

TABLE DES MATIÈRES

	<i>Pages</i>
INTRODUCTION	11
1. Définition du lathyrisme	13
2. Agents étiologiques	14
3. Description des lésions de l'ostéolathyrisme	16
A. Mode de production	16
B. Anatomie pathologique	16
1) Aspect macroscopique — Evolution	16
2) Aspect microscopique	20
a) le squelette	20
b) l'arbre vasculaire	21
c) le derme	21
3) Etudes histochimiques et autoradiographie	21
C. Aspect submicroscopique et pathologie moléculaire	23
1) Structure moléculaire du collagène normal	23
a) chimie	23
b) physico-chimie	27
c) microscopie électronique	29
d) propriétés physiques du collagène	34
e) structure supra-moléculaire du collagène normal	36
2) Microscopie électronique des tissus d'animaux lathyriques	37
3) Pathologie moléculaire de l'ostéolathyrisme	38
RÉSUMÉ DE L'INTRODUCTION	41
EXPOSÉ DU TRAVAIL	45
MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
Matériel	51
Méthodes	52

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre I. — Effet de l'intoxication lathyrique sur les propriétés physico-chimiques du collagène de l'embryon	59
1. Fragilité des tissus normaux	61
2. A. Fragilité des tissus lathyriques	67
B. Relations entre dose et effet du lathyrogène	69
Conclusions du Chapitre I	72
Chapitre II. — Etudes <i>in vitro</i>	75
A. Collagène purifié	77
1. Préparation du collagène	77
2. Effets des différents paramètres (pH, concentration, chauffage préalable)	78
B. Collagène des tissus <i>in vitro</i>	83
C. Collagène <i>in situ</i>	87
Conclusions des études <i>in vitro</i>	90
Chapitre III. — Etudes métaboliques préliminaires (par refroidissement de la température d'incubation des embryons)	91
Conclusions des études préliminaires	100
Chapitre IV. — Etudes métaboliques	101
A. Métabolisme du B.A.P.N.	103
1. Isolement et caractérisation des métabolites	104
2. Présence de B.A.P.N. ou de ses métabolites dans le collagène	116
B. Métabolisme du collagène lathyrique	119
Conclusions des études métaboliques	124
DISCUSSION	125
1. Signification de l'étude de la fragilité	127
2. Effets des lathyrogènes <i>in vitro</i>	132
3. Etudes <i>in vivo</i>	136
ANNEXE	139
CONCLUSIONS GENERALES	145
BIBLIOGRAPHIE	149

INTRODUCTION

1. DÉFINITION DU LATHYRISME

L'OSTÉOLATHYRISME expérimental ou odoratisme est la maladie qui survient chez l'animal d'expérience soumis à un régime riche en pois de senteur (*Lathyrus Odoratus*), ou intoxiqué par la substance active qui en est extraite (B.A.P.N. : bêta-amino-propionitrile).

Le terme lathyrisme se rencontre dès 1841 (CHEVALIER) pour désigner les intoxications provoquées chez l'homme par l'ingestion de légumineuses (*Lathyrus Sativus*, *L. Cicerus*, *L. Pusillus*).

Ces intoxications sont connues depuis Hippocrate et ont été décrites sous toutes les latitudes (Allemagne, Italie, Russie, Indes) comme ayant un caractère épidémique pendant les années de famine au cours desquelles des quantités importantes de gesses (gesse commune : *L. Sativus*, gesse clymène : *L. Clymenum*, gesse chiche : *L. Cicerus*) sont incluses dans le régime alimentaire (SELYE, 1957).

Le lathyrisme est chez l'homme une affection neurologique irréversible se caractérisant par l'installation brutale d'une paraparésie avec hyperréflexie ; plus rarement, cette attaque peut être précédée de sensations paresthésiques et accompagnée de troubles de la sensibilité portant sur les différents modes. Les cas les plus graves se terminent par une paraplégie spastique avec perte de contrôle des sphincters (STOCKMAN, 1929). L'intoxication est si rarement mortelle que, malgré les milliers de cas observés et décrits, il n'existe à notre connaissance que deux rapports d'autopsies ; l'un d'eux (FILIMONOFF, 1926) décrivant un cas où l'intoxication avait été contractée 30 ans auparavant, et l'autre, un cas subclinique (BUZZARD, 1921).

Les protocoles de ces autopsies décrivent une dégénérescence des faisceaux pyramidaux latéraux et ventraux, des faisceaux spinocérébelleux de FLECHSIG et GOWERS ainsi qu'une dégénérescence de type rétrograde des cellules de Betz du lobe paracentral (FILIMONOFF).

Cette intoxication affecte également les grands herbivores domestiques ; chez le cheval nourri de gesses, elle se traduit par des parésies, de l'hyperréflexie, et une paralysie du récurrent (SZCZEPANSKI, 1913).

Dans le but d'étudier le mécanisme d'action de ces intoxications, divers animaux de laboratoire ont été soumis à une alimentation riche en gesses ou en extraits de celles-ci. Aucun auteur cependant, depuis MINGAZZINI et BUGLIONI en 1896 jusqu'à JIMENEZ-DIAZ, ORTIZ DE LANDAZURI et RODA (1943), n'est parvenu à reproduire chez le rat, le lapin et d'autres rongeurs ou carnassiers de laboratoire, les symptômes observés au cours de la maladie spontanée de l'homme.

GEIGER, STEENBOCK et PARSONS (1933), en administrant au rat de la farine de pois de senteur (*Lathyrus Odoratus*), ont produit chez cet animal des lésions du tissu conjonctif dont l'histologie a été précisée par ROBINSON et BAST dès 1934. Ces lésions consistaient essentiellement en hernies de la paroi abdominale, en cyphoscolioses par glissements épiphysaires, subluxations par glissement des cartilages articulaires, épaississements périostés et ostéophytes aux zones d'insertion des muscles les plus puissants.

Les anomalies décrites par ces auteurs ont été retrouvées et étudiées plus tard par DASLER (1954a) ; le tableau clinique est à ce point différent de celui des intoxications spontanées que SELYE a proposé (1957) de distinguer ces deux syndromes en réservant la dénomination de « neurolathyrisme » à l'intoxication spontanée de l'homme et des grands herbivores, et d'« ostéolathyrisme » ou « odoratisme » à l'ensemble des symptômes caractérisant l'intoxication expérimentale par les pois de senteur.

2. AGENTS ÉTIOLOGIQUES

Le principe actif de la farine de pois de senteur (*Lathyrus Odoratus*) a été isolé et identifié comme étant le bêta-amino-propionitrile (B. A. P. N., tableau 1), présent dans les pois sous forme de γ -L-glutamyl (DASLER, 1954c).

L'administration de substances de formule voisine obtenues synthétiquement provoque chez l'animal une symptomatologie identique à celle décrite pour l'intoxication par les pois de senteur ; tel est le cas de l'aminoacétonitrile (PONSETI, WAWZONEK, FRANKLIN *et al.*, 1956), du semi-carbazide (NEUMAN, MAXWELL et MAC COY, 1956) et de la mercaptoéthylamine (DASLER, 1955).

TABLEAU 1
Formules de différentes substances de structure voisine
(lathyrogènes* non lathyrogènes)

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$	bêta-amino-propionitrile (*)
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CN}$	amino-acétonitrile (*)
$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$	semicarbazide(*)
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$	mercaptoéthylamine (*)
$\text{CN}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CO}_2\text{H}$	bêta-cyano-l-alanine
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CN} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	bis- β -cyano-éthylamine
$\text{NH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$	benzhydrazide (*)
$\text{NH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4$	hydrazide de l'acide nicotinique (*)
$\text{NH}_2-\text{NH}_2-\text{H}_2\text{O}$	hydrate d'hydrazine (*)

Cependant, certaines molécules tout aussi proches du B.A.P.N. que celles énumérées ci-dessus, n'exercent aucun effet toxique : c'est le cas notamment de l'éthanolamine et de l' α -propionitrile.

Des substances assez voisines ont été extraites d'autres légumineuses : par exemple, la bêta-cyano-l-alanine (extraite de *Vicia Sativa*) (RESSLER, 1962), ou bien obtenues par synthèse, telles le bis bêta-amino-propionitrile (HARTMANN et STICH, 1957), le bis bêta-cyano-éthylamine (HARTMANN, LALICH et AKERT, 1958). Les deux premières sont responsables d'une symptomatologie nerveuse caractérisée par une modification du comportement des animaux intoxiqués ; la troisième provoque un syndrome d'hyperréflexivité suivi d'ataxie ; aucune de ces trois substances n'exerce d'influence sur le tissu conjonctif.

C. I. LEVENE (1961) a décrit plusieurs familles de composés chimiques dont l'administration provoque chez l'embryon de poulet l'apparition de symptômes caractéristiques de l'intoxication lathyrique (GROSS, LEVENE et ORLOFF, 1960). Outre les nitriles précédemment cités, il mentionne également les uréides (par ex. la semi-carbazide), les hydrazides (l'hydrazide de l'acide nicotinique, la benzhydrazide) et les hydrazines (telle l'hydrate d'hydrazine).

3. DESCRIPTION DES LÉSIONS DE L'OSTÉOLATHYRISME

A. MODE DE PRODUCTION

L'ostéolathyrisme a été provoqué chez un grand nombre d'animaux de laboratoire, à des stades divers de leur développement.

Cette intoxication a été étudiée chez des têtards de Xénops en voie de métamorphose (CHANG, WITSCHI et PONSETI, 1955 ; LEVY, 1959) ; dans diverses espèces d'oiseaux : embryons de poulets (ROSENBERG, 1957 ; GOERTTLER et HARTMANN, 1961), dindons, canards, poulets en cours de croissance (BARNETT, BIRD, LALICH et STRONG, 1957 ; CARLTON, 1965 ; BÉLANGER, 1959) ; chez des rongeurs : embryons de rat (STAMLER, 1955), rats et lapins en cours de croissance et adultes (DASLER, 1954a ; CASTELLANI et CASTELLANI-BISI, 1958) et chez le jeune chien (ENGELDT, TEGNER et BERGQUIST, 1960).

Les substances toxiques, qu'il s'agisse de la farine du pois de senteur, de son extrait purifié, du B.A.P.N. ou des analogues de ce dernier, peuvent être administrées par les voies les plus diverses : la farine peut être mêlée à la nourriture ou administrée par gavage ; il en est de même pour les lathyrogènes chimiques, qui, en outre, peuvent être dissous, soit dans les boissons, soit dans l'eau d'aquarium.

Des solutions stériles de lathyrogène peuvent être injectées par voie intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, ou bien encore, chez les embryons d'oiseaux, sous la membrane chorio-allantoïdienne.

B. ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Les lésions produites par les agents lathyrogènes peuvent se décrire à divers niveaux.

1. Aspect macroscopique et évolution

On observe les lésions suivantes chez les embryons et les animaux à l'âge de la croissance :

— Les têtards de Xénops en cours de métamorphose (CHANG *et al.* 1955) présentent des malformations des membres inférieurs consistant en subluxations des articulations, laxité des tissus périarticulaires et atrophie de la musculature.

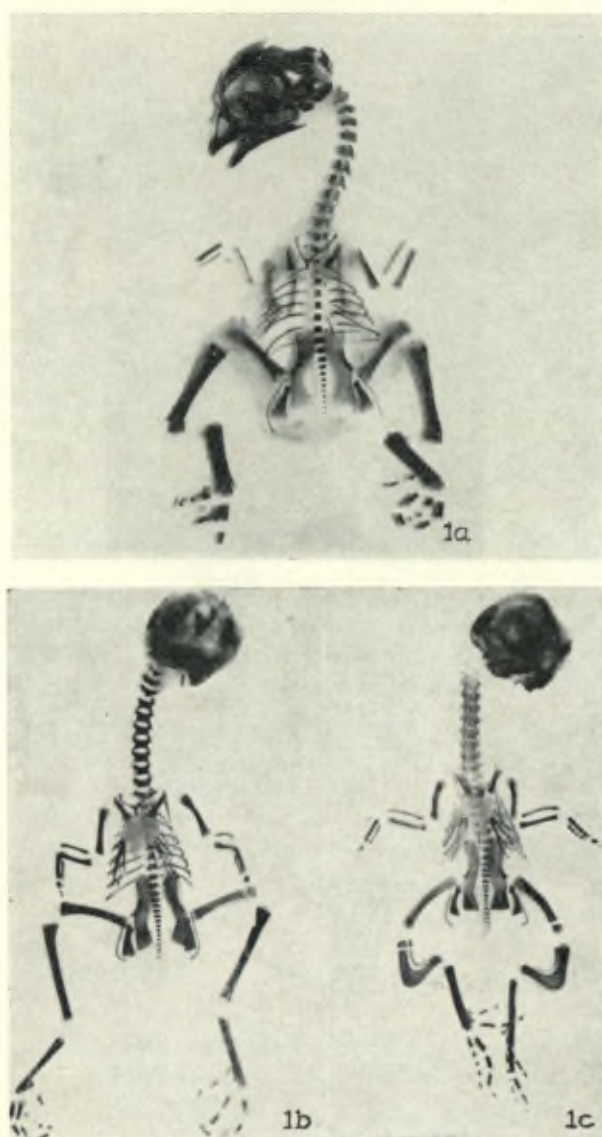


FIG. 1. Photographies de squelettes d'embryons de poulets lathyriques de 17 jours.

- 1a) Injecté de 20 mgr de B.A.P.N. à 14 jours : l'aspect ramassé est accentué par les luxations tibio-tarsiennes et fémoro-tibiales.
- 1c) Injecté de 0,32 mgr de B.A.P.N. à 4 jours : noter l'incurvation des os longs.
- 1b) Embryon normal de 17 jours.

(Tirée de LEVENE, 1959).

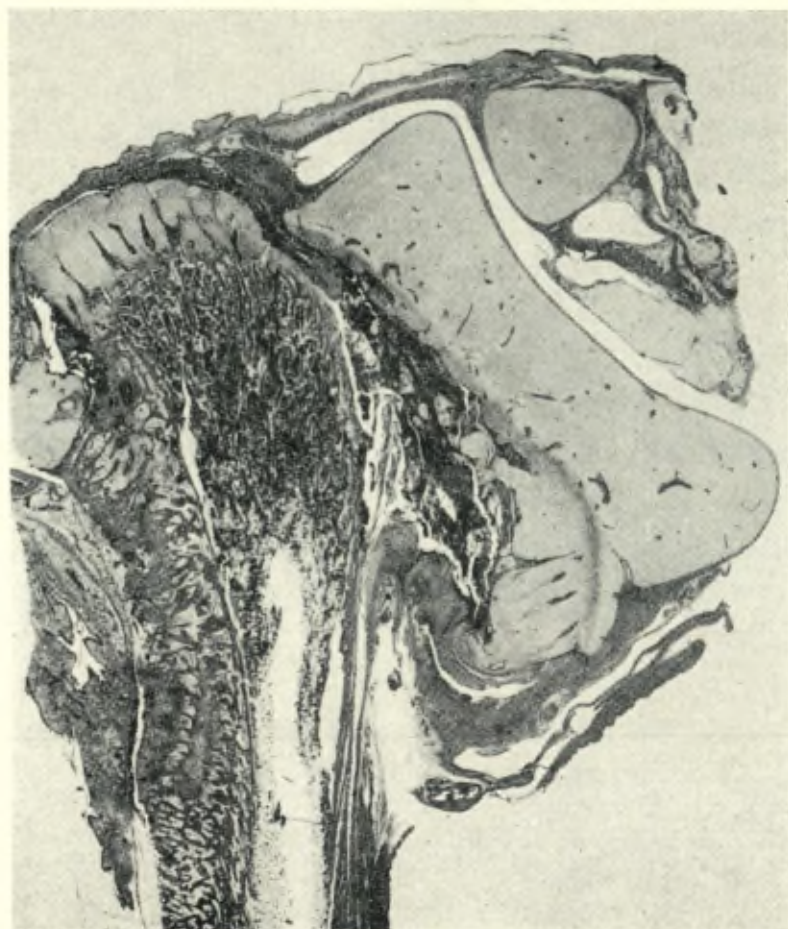


FIG. 2. Faible grossissement ($\times 6$) de l'extrémité proximale du tibia d'un poussin de 17 jours maintenu à une diète lathyrogène depuis 7 jours. Glissement épiphysaire important et croissance osseuse hypertrophique anormale dans la région découverte par glissement (en haut à gauche de la figure).

(Tirée de BÉLANGER, 1959.)

— L'embryon de poulet se présente tassé (fig. 1) ; cet aspect est dû à l'épaississement et à l'incurvation des os longs, à de l'épiphysiolyse entraînant des subluxations (NEUMAN *et al.*, 1956) (fig. 2).

Outre des lésions osseuses, on a décrit des hémorragies profuses, amniotiques, chorio-allantoïdiennes ou sous-cutanées, des dilatations anévrismales des artères périphériques, de l'aorte, du bulbe et du tronc artériel (GOERTTLER *et al.*, 1961) ainsi que des agénésies de la paroi thoracique et abdominale (ROSENBERG, 1957).

— Chez le rat, le même type de lésion se retrouve chez des embryons dont la mère a été soumise à l'administration de substances lathyrogènes pendant la fin de la gestation (STAMLER, 1955).

Chez les animaux en croissance, on rencontre des déformations analogues à celles décrites chez l'embryon : anévrismes disséquants de l'aorte (LALICH, 1956), dislocations épiphysaires des os longs.

En outre, on observe des phénomènes d'ossification aux zones d'insertion des tendons, des cyphoscolioses sévères par épiphysiolyse, des calcifications du nucléus pulposus, des hernies discales intrasomatiques, des protrusions discales et des fractures spontanées (GEIGER *et al.*, 1933 ; PONSETI et SHEPARD, 1954).

L'intoxication chronique par les agents lathyrogènes s'accompagne d'une aggravation progressive des symptômes locaux, ainsi que de l'installation d'un marasme dans lequel sombrent et meurent les animaux, à moins qu'ils ne soient emportés par une complication directe, telle la rupture d'un anévrisme, ou indirecte, telle la compression médullaire par une scoliose très marquée (fig. 3).



FIG. 3. Aspect radiographique d'une scoliose dorso-lombaire (séquelle d'un décollement épiphysaire) chez un rat adulte.

(Tirée de RAMANURTI, 1959.)

Lorsque l'administration des substances toxiques est interrompue après obtention de déformations ostéoarticulaires mineures, celles-ci peuvent régresser entièrement chez l'animal jeune (RAMAMURTI, 1958) ou continuer à évoluer pour leur propre compte chez l'animal adulte, réalisant le tableau clinique d'une arthrose vertébrale et, ou, périphérique dont la gravité est fonction de l'importance des lésions apparues en début d'intoxication.

2. Aspect microscopique

a) LE SQUELETTE

Les lésions les plus caractéristiques siègent au niveau des cartilages de conjugaison : l'aspect ordonné des chondroblastes et des trabécules en voie d'ossification fait place à une disposition anarchique tant des cellules que des trabécules, à un élargissement de toute l'épiphyse avec apparition de fentes transversales rompant l'alignement des cellules et interrompant la continuité des structures (AMATO et BOMBELLI, 1959 ; RAMAMURTI et TAYLOR, 1959 ; cf. fig. 4).

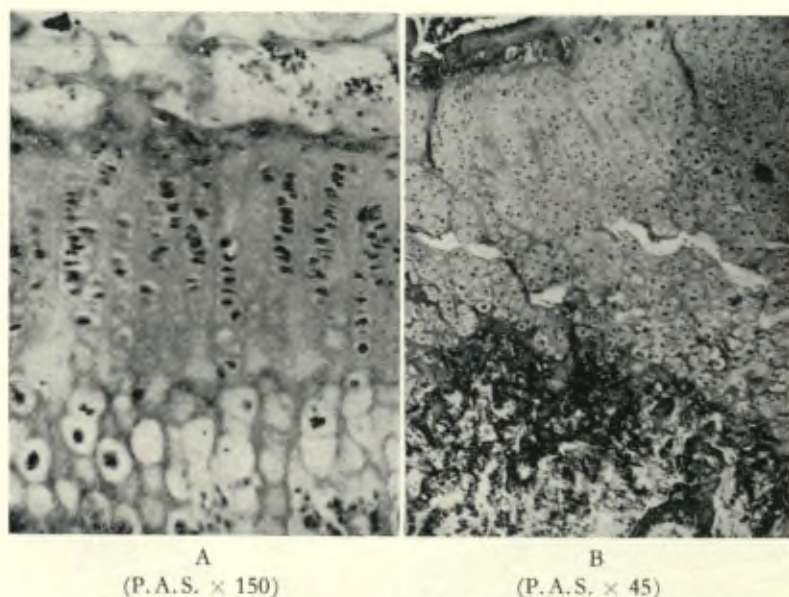


FIG. 4. Comparaison entre la disposition régulière des cellules chondrales dans le cartilage épiphysaire du tibia d'un rat normal (A) et l'irrégularité de leur disposition dans le tibia d'un rat lathyrique (B). On remarquera sur B la présence de fissures dans le cartilage ainsi que de plages de matériel P.A.S. positif.

(Tiré de RAMAMURTI *et al.*, b).

Au voisinage des muscles les plus actifs et les plus puissants (adducteurs et pectiné aux membres inférieurs, deltoïde aux membres supérieurs) YEAGER et HAMRE (1957) observent chez le rat des zones de décollement périoste au sein desquelles prend naissance un tissu osseux de néoformation, riche en grandes cellules chondrales, et dont l'épaisseur peut atteindre jusqu'à plusieurs fois celle du cortex normal.

La partie interne du périoste est fortement épaissie ; on lui distingue les particularités suivantes :

- 1) La zone périphérique est constituée presque exclusivement de cellules fusiformes en voie de prolifération, moins différenciées que chez les animaux témoins et ressemblant aux cellules mésenchymateuses pré-ostéoblastiques du tissu membraneux en voie de formation ;
- 2) La partie moyenne est riche en substances intercellulaire tant fibreuse qu'amorphe ; les cellules y sont arrondies mais n'ont pas encore la morphologie d'ostéoblastes ou d'ostéocytes ;
- 3) Enfin, la partie profonde contient des spicules d'os immature bordés d'ostéoblastes et des cavités tapissées de cellules prémédullaires et traversées en leur centre par un petit vaisseau.

b) L'ARBRE VASCULAIRE

Dans ce cas, les anomalies sont parallèles à celles des tissus irrigués : l'alignement des capillaires épiphysaires et métaphysaires de l'os en croissance est rompu et il apparaît de multiples extravasations sanguines (AMATO *et al.*, 1959).

Dans les parois des vaisseaux de moyen calibre ainsi que dans celles des ébauches cardiaques de l'embryon de poulet, on observe de multiples foyers de nécrose (GOERTTLER *et al.*, 1961). Les parois aortiques des rats intoxiqués (LALICH, BARNETT et BIRD, 1957) sont le siège d'hyalinisation en foyers et de vacuolisation de la média ainsi que d'une fragmentation des fibres élastiques.

c) LE DERMES

Les lésions y sont plus discrètes ; ainsi VAN DEN HOOFF, LEVENE et GROSS (1959) ne décrivent chez l'embryon de poulet qu'une diminution de l'épaisseur et un relâchement de la structure fibreuse de la peau.

3. Etudes histo-chimiques et autoradiographie

Les altérations témoignant d'un chimisme perturbé de la substance fondamentale ont été mises en évidence par des modifications des

affinités tinctoriales du tissu conjonctif par l'histochimie et l'autoradiographie.

Dans le cartilage épiphysaire de l'os de rat en croissance, les polysaccharides neutres (PAS positifs) sont plus abondants ou ont un aspect plus granulaire que chez les animaux normaux (VAN DEN HOFF, 1963) cependant les propriétés métachromatiques de ce tissu sont estimées de façon variable selon les auteurs et pour BÉLANGER (1959), il n'y aurait pas de différence entre les contenus en mucopolysaccharides acides des cartilages normaux et lathyriques. Il convient de noter, pour éclaircir ces discordances, que les modifications de la substance fondamentale ne s'observent chez les animaux lathyriques qu'après une certaine période de latence et que celle-ci peut être différente selon l'espèce, l'âge de l'animal intoxiqué ainsi que selon la dose de lathyrogène administrée.

La paroi aortique des rats lathyriques s'enrichit progressivement en mucopolysaccharides acides au point d'en devenir complètement envahie, mais sans que ce phénomène s'accompagne de prolifération cellulaire (GILLMAN et HATHORN, 1959).

Les études histochimiques ont exploré divers groupes d'enzymes et de fonctions protéiques dans les cartilages de croissance et le périoste. L'amylo-phosphorylase (YEAGER et BACH, 1962), les groupements aminés libres et les groupements sulfhydriques (YEAGER et GUBLER, 1963) ont été trouvés identiques chez les rats normaux et lathyriques ; la déshydrogénase lactique, la glucose-6-phosphate déhydrogénase et la phosphogluco-isomérase sont déprimées chez les lapins lathyriques (KUHLMAN, 1961) ; par contre, l'activité phosphatasique alcaline des tissus est nettement plus élevée (ASCHKENASY, AUFFRET et PIETTE, 1959).

Grâce aux techniques autoradiographiques, ENGFELDT, 1960, a étudié chez le chien l'incorporation du soufre marqué dans les tissus lathyriques ; il a démontré les anomalies du métabolisme des mucopolysaccharides sulfatés : plusieurs jours après l'intoxication, ces composés se trouveraient en quantité réduite dans la substance fondamentale du cartilage de conjugaison (ENGFELDT *et al.*, 1960). PRAUS, BRETT-SCHNEIDER, HVEZDOVA et STERBOVVA (1965) ont fait des constatations analogues au niveau de la cornée.

HULTH (1965) confirme ces résultats chez le rat, mais observe que la morphogenèse cellulaire dans l'os lathyrique est identique à celle de tout os en phase de croissance rapide.

C. ASPECT SUBMICROSCOPIQUE ET PATHOLOGIE MOLÉCULAIRE

1. Structure moléculaire du collagène normal

Les données récentes de la littérature établissent l'altération précoce du collagène au cours de l'intoxication par les lathyrogènes.

Afin de bien situer la présente étude, il convient de rappeler la structure normale de cette molécule et l'organisation de celle-ci en fibres au sein des tissus d'animaux normaux.

Le collagène appartient au groupe des protéines fibreuses dont il est un des éléments pondéralement les plus abondants : outre les tendons où il se trouve pratiquement à l'état pur, il constitue l'essentiel de la trame protéique des os et des dents (osséine et dentine) ainsi qu'une part importante du derme, des cartilages et de la cornée. On le trouve encore dans les parois des vaisseaux, dans le tissu de soutien des parenchymes hépatiques, splénique ou rénal ainsi que dans les ramifications du tissu conjonctif intercellulaire.

a) CHIMIE

Le collagène est une protéine fibreuse d'un poids moléculaire de 300.000 que l'on retrouve dans le tissu de soutien de tous les vertébrés et même chez de nombreux intervertébrés (annélides, éponges à squelette collagène par exemple). Sa composition en acides aminés n'est pas identique dans les différentes espèces, mais elle présente certaines caractéristiques qui permettent de la reconnaître. Citons parmi celles-ci (tableaux 2 et 3) : la présence en quantités à peu près égales de proline et d'hydroxyproline (ce dernier imino-acide, de même que l'hydroxyllysine ne se trouve quasi exclusivement que dans le collagène et l'élastine), une quantité importante de glycine (environ 1/3 des résidus), une pauvreté extrême en acides aminés soufrés et en tyrosine. L'hydrolyse partielle a permis de préciser l'existence d'une séquence privilégiée de 3 acides aminés Gly-Pro-X, où Pro peut être la proline ou l'hydroxyproline et X un acide aminé quelconque. A ces particularités que l'on pourrait qualifier de macroscopiques, il convient d'en ajouter d'autres dont l'existence plus discrète et plus difficile à mettre en évidence n'en confère pas moins à la protéine une formule très peu commune : on y trouve 12 résidus d'hexoses par molécule (5 glucoses et 7 galactoses, GALLOP, 1966) ; de plus chaque molécule de collagène contient un ou

TABLEAU 2

**Composition en acides aminés : comparaison entre
le collagène et diverses protéines du règne végétal et animal**

Les chiffres désignent le poids d'azote exprimé en pour cent de l'azote total.
(Tiré de White, 1959, p. 164)

Acides aminés . . .	Colla- gène (Géla- tine)	Insuline (bovine)	Lacto- globu- line	Sérum albu- mine (bovine)	Fibrine de la soie	Zéine (maïs)
Alanine	9,3	4,5	7,1	6,25	31,0	10,5
Amide NH ₂	0,1	1,7	1,3	0,95	0,1	3,6
Arginine	8,6	3,1	2,9	5,9	1,1	1,7
Aspartic acid . . .	6,8	6,7	11,5	10,9	2,8	4,6
Cystéine	0	0	1,1	0,3	0	0
Cystine		12,2	2,3	6,2	0,2	0,6
Glutamic acid . . .	11,0	17,9	19,1	16,5	2,0	26,0
Glycine	25,5	5,2	1,4	1,8	44,0	0
Histidine	0,7	5,4	1,6	4,0	0,4	1,3
Hydroxyproline . .	13,0	0	0	0	—	0
Hydroxylysine . . .	1,3	0	0	0	0	0
Isoleucine	1,7	2,3	5,9	2,6	1,1	6,9
Leucine	3,5	13,5	15,5	12,3	0,8	15,4
Lysine	4,6	2,6	12,6	12,8	0,7	0
Méthionine	1,1	0	3,2	0,8	0,15	1,5
Phénylalanine . . .	2,3	8,6	3,8	6,6	1,3	7,0
Proline	14,2	2,1	5,1	4,75	0,7	
Sérine	3,2	5,3	4,0	4,2	16,2	
Thréonine	2,2	2,0	4,9	5,8	1,6	3,4
Tryptophane	0	0	1,9	0,6	0,4	0,1
Tyrosine	0,5	12,6	3,6	5,1	12,0	5,0
Valine	2,7	9,7	5,6	5,9	3,5	3,3
Nombre des acides aminés en % de l'azote total	92	100	100	101	97	89

TABLEAU 3

Teneur en acides aminés de collagène provenant d'animaux d'espèces différentes
(Nombre de résidus par mille)

	Gélatine			Collagène						Réticuline	
	insoluble			acido-soluble			neutro-soluble				
	Peau de bœuf			Peau de rat			Tissu de granulome du cobaye			Peau de lapin	Rein humain
	Eastoe (1955)	Bowes, Elliot et Moss (1955)		Piez, Eigner et Lewis (1963)			Eastoe (1961)			Jackson <i>et al.</i> (1958)	Windrum <i>et al.</i> (1955)
				($\alpha + \beta$)	α_1	α_2	Nucléaire	Mito-chondrial	Micro-somal		
Alanine	112	110	115	106	112	102	101	102	93	101	97
Glycine	333	335	341	331	330	336	324	300	263	296	309
Valine	20	20	19	24	20	32	21	24	29	27	27
Leucine	23	27	24	24	18	32	26	29	42	30	36
Isoleucine	12	14	10	11	6,4	16	12	13	22	17	18
Proline	129	119	111	121	129	113	116	110	102	112	97
Phénylalanine	12	13	12	11	12	10	12	15	19	15	18
Tyrosine	1,5	5,1	2,8	2,4	2,1	2,4	3,2	4,8	11	5,6	3,0
Sérine	37	38	40	43	42	43	44	49	52	45	43
Thréonine	17	18	18	20	20	20	20	25	32	27	22
Méthionine	5,5	6,2	5,1	7,8	8,0	6,1	8,3	6,9	6,0	6,5	8,6
Arginine	46	45	47	51	49	51	52	56	59	48	45
Histidine	4,5	4,3	1,9	4,9	1,9	8,5	6,2		9,9	7,2	5,3
Lysine	28	26	24	28	30	22	26	28	36	32	22
Acide aspartique	46	49	45	46	46	44	48	54	62	55	53
Acide glutamique	71	72	74	71	74	66	68	72	76	76	77
Hydroxyproline	98	93	102	93	97	86	104	100	80	97	108
Hydroxylysine	5,5	6,6	7,8	5,7	4,3	8,0	8,8		7,6	4,8	12

(Tiré de J.E. EASTOE, 1966.)

deux résidus dont la nature n'est pas déterminée avec précision, mais qui se caractérisent par l'existence d'une fonction aldéhyde soit sous la forme libre, soit la forme hémi-acétal (GALLOP *et al.*, 1966) ; enfin on a décrit dans le collagène la présence de phosphore organique sous la forme de phosphosérine ou plus vraisemblablement de phospho-hexose (GLIMCHER *et al.*, 1964).

La constance de ces caractéristiques d'espèce en espèce suppose un degré de purification de la protéine qui repose sur des méthodes d'extraction dérivées des propriétés de solubilité du collagène ; celles-ci, décrites depuis près de 100 ans (GILETTE, 1872 ; NAGEOTTE, 1927), ont permis de distinguer :

- a) le collagène neutro-soluble, que l'on peut extraire à l'aide de tampons à pH 7,6 et à différentes forces ioniques (GROSS *et al.*, 1955) ;
- b) le collagène acido-soluble, extrait par des solutions diluées d'acides (citrique ou acétique) de pH 3,2 à 4,6 (TUSTANOWSKI, 1947) ;
- c) le collagène insoluble ou résiduel qui ne peut être extrait des tissus qu'au prix d'une dénaturation de la protéine en milieu alcalin et à chaud.

Une telle classification, basée uniquement sur des critères physico-chimiques, peut paraître arbitraire sur le plan biologique ; un dépouillement attentif des données purement chimiques montrera cependant que tel n'est pas le cas ; en effet, après dénaturation prudente d'une solution de collagène pur (neutro ou acido-soluble), il est possible de démontrer que la molécule en est formée par deux unités de base (α_1 et α_2) de poids moléculaire et de composition en acides aminés très voisins (80 à 100.000 ; tableaux 3 et 4) ; ces unités sont associées trois par trois.

Cette association est formée d'un doublet β constitué par deux peptides α ($\beta_{1-1} = 2\alpha_1$; $\beta_{1-2} = \alpha_1 + \alpha_2$) et d'un peptide α . La proportion de chaînes α et β entrant dans la composition d'une molécule de collagène permet de distinguer le collagène neutro-soluble du collagène acido-soluble (fig. 6 et 10).

Les peptides de base une fois isolés, il a été possible d'en déterminer la composition et la figure 5 donne une représentation de la molécule de collagène neutro-soluble (tropocollagène = $2\alpha_1$ et $1\alpha_2$) qui rend apparente, dans chaque peptide de base, l'existence de sous-unités réunies entre elles par l'intermédiaire d'un résidu de tyrosine et d'un pont glycidique (GUSTAVSON, 1964).

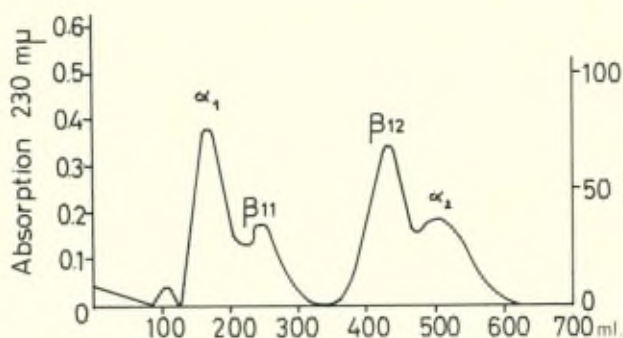


FIG. 6. Diagramme d'élution de collagène dénaturé à 40° C.

Collagène acido-soluble de rat normal (colonne de carboxyméthyl cellulose.)

(Tiré de MARTIN, 1961.)

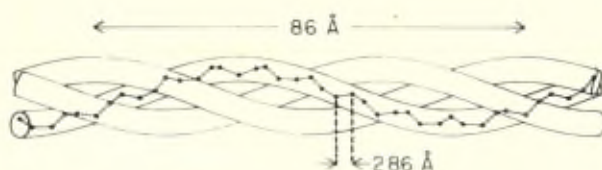


FIG. 7. Représentation de la structure hélicoïdale de la molécule de collagène.

Cette figure indique la distance (2,86 Å) entre deux carbones α d'une chaîne polypeptidique hélicoïdale et la longueur (86 Å) du pas de vis formé par l'enroulement d'un peptide autour des deux autres.

Il existe un troisième enroulement (BURGE, 1966), celui de la molécule toute entière autour de son axe ; le pas de vis de cet enroulement (imperceptible à l'échelle de cette figure) est de 400 Å.

(Tiré de PIEZ, 1963.)

Les études cristallographiques par diffraction des rayons X ont donné la clef du problème en montrant que chacune des chaînes était constituée par une spirale d'acides aminés, spirale à laquelle la teneur élevée en proline et hydroxyproline conférait une certaine rigidité (fig. 8a).

Selon STEINBERG et coll. (1960), les molécules de proline dans une chaîne de polyproline sont disposées de telle sorte que leurs carbones α peuvent se trouver en position *cis* ou *trans* par rapport à la liaison peptidique (fig. 8b) ; les atomes d'hydrogène des carbones α peuvent être eux-mêmes en position *cis'* ou *trans'* par rapport à l'oxygène du groupe $-C=O$ de la liaison peptidique. Il apparaît des travaux de ces auteurs que la configuration *trans'* est seule compatible avec le remplacement d'une proline par une hydroxyproline et que la configuration *trans-trans'* s'accommode de la présence à la fois d'une hydroxyproline et d'une glycine dans la chaîne.

La rigidité de la molécule entière est renforcée encore par le fait que les trois hélices α_1 , α_2 et α_3 sont disposées l'une autour de l'autre en spirale également ; enfin le câble par lequel on peut se représenter la molécule de collagène serait légèrement torsadé sur lui-même de telle sorte que sa rigidité se trouverait être la résultante d'une structure en triple hélice dont la première aurait un pas de vis de 2,86 Å, la seconde 86 Å et la troisième, 411 Å (fig. 7 ; PIEZ, 1963 ; BURGE, 1966).

La cohésion de cet ensemble est assurée en ordre principal par les nombreux ponts hydrogène qui s'établissent entre les peptides de base ; selon l'hypothèse de RAMACHANDRAN (1961) qui admet l'existence de deux de ces ponts entre deux séries voisines de trois acides aminés situés sur deux peptides de base voisins il n'y aurait pas moins de 490 liaisons H entre deux chaînes α sur toute leur longueur. En sus de ces liaisons, faibles mais nombreuses, existent entre les peptides des liaisons covalentes, des liaisons esters, des liaisons par l'intermédiaire de groupements méthionyl (BORNSTEIN et PIEZ, 1965) et peut-être enfin des liaisons par l'intermédiaire des résidus aldéhydes dont nous avons fait mention plus haut.

c) MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Une structure aussi hautement élaborée ne peut manquer de se refléter sur l'organisation des tissus riches en collagène, qu'il s'agisse des tendons, du tissu conjonctif du derme et de différents parenchymes ou de la matrice protéique de l'os ou de la dentine.

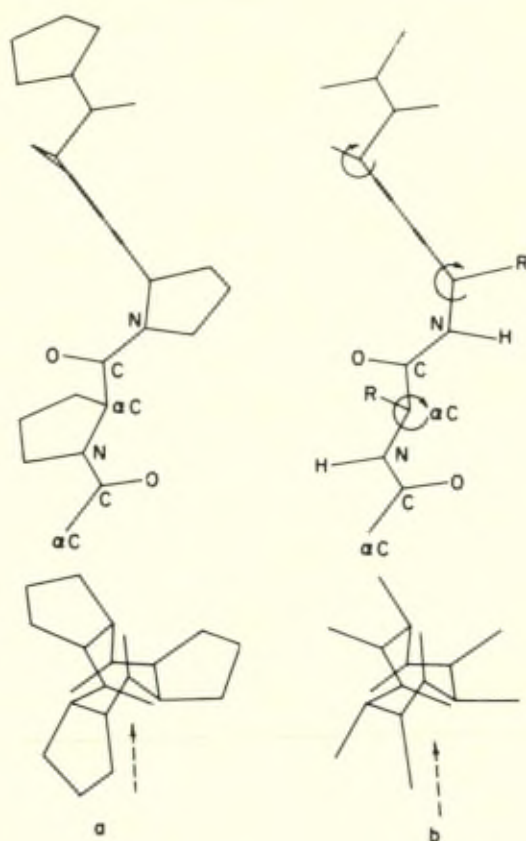


FIG. 8a. a) Chaîne hélicoïdale de poly-L-proline.

On constate que le groupement pyrrolique rend impossible les mouvements de rotation autour du carbone alpha de la chaîne, bloquant les résidus de proline en position trans-trans'.

b) Même type de chaîne préparé à partir d'acides alpha aminés.

Le résidu R est libre d'effectuer un mouvement de rotation autour du carbone alpha.

(Tiré de VON HIPPEL, 1959.)

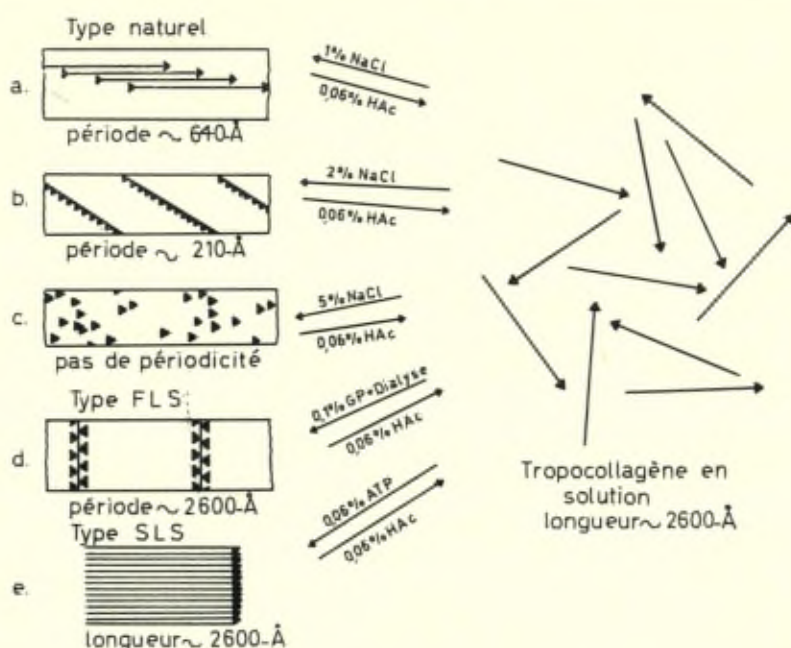


FIG. 9. Schéma des opérations simples (dialyses en milieux appropriés), qui permettent de précipiter, de façon réversible, le collagène sous différentes formes : la partie droite de la figure schématique représente une solution de collagène en milieu acide.

Les flèches d'équilibre entre la partie droite et la partie gauche symbolisent les opérations de dialyse par lesquelles il faut faire passer la solution initiale pour obtenir une précipitation du collagène sous forme des fibres schématisées dans la partie gauche de la figure (GP + dialyse signifie dialyse en présence de glycoprotéines ; ATP : acide adénosine triphosphorique ; HAC : acide acétique).

(Tiré de GLIMCHER, 1959.)

ainsi obtenus, lorsqu'ils sont examinés en microscopie électronique, diffèrent d'aspect : une dialyse en présence de solution saline faiblement hypertonique précipite un feutrage de fibrilles dont la morphologie est identique à celle des fibrilles observées dans les tissus ; par contre une dialyse en présence d'acide adénosine triphosphorique précipitera des fibres dites Segment Long Spacing, tandis qu'en présence de glycoprotéines on observera des fibres Fibrous Long Spacing. Or, non seulement ces précipités sont réversibles, mais la solution qui a donné naissance à

l'un d'eux peut successivement donner naissance aux deux autres à condition d'être placée dans les conditions de dialyse appropriées.

L'interprétation (fig. 9) que les auteurs américains ont donnée de ces phénomènes a été suivie d'un développement rapide des connaissances concernant la structure de la molécule à partir de sa représentation photographique.

En effet, SCHMITT et coll. ont postulé que les fibres Segment Long Spacing étaient formées de molécules de protéine accolées côte à côte orientées toutes dans la même direction ; cette orientation confère aux rubans ainsi formés l'ombrage qui les caractérise après exposition aux sels d'uranyle, à l'acide phospho-tungstique ou au molybdate d'ammonium, ombrage qui dépend essentiellement de la densité des diverses régions de la molécule en groupes polaires libres, de charges différentes.

Les molécules étant orientées dans le même sens tous les groupes identiques se trouvent en registre et dessinent un profil asymétrique de la molécule.

Par contre, les fibres Fibrous Long Spacing sont dues à la juxtaposition en tête-bêche des molécules de protéine bout à bout et côte à côte ; de cette manière, les produits de contraste dessinent un profil symétrique dû à la superposition en sens diamétralement opposés des caractéristiques de charge de chaque molécule ; on observe donc dans ces fibres une périodicité fondamentale de 2.800 à 3.000 Å et une sub-périodicité symétrique beaucoup plus fine, identique dans chaque période principale.

Enfin, les fibres à périodicité 700 Å résultent d'un accollement bout à bout, côte à côte, et en marches d'escalier, chaque molécule de collagène étant décalée par rapport à sa voisine d'un quart de sa longueur, toutes les molécules étant orientées dans le même sens. Cette forme particulière d'imbrication confère aux fibres de collagène des tissus leur remarquable cohésion ; elle se retrouve dans tous les tissus de soutien, c'est-à-dire partout où du collagène est présent dans l'organisme ; la seule exception à cette règle est constituée par la cornée où les molécules sont décalées d'un treizième de leur longueur, ce qui confère aux fibres une striation d'une périodicité de 220 Å.

Ces études, où la microscopie électronique contribue à l'enrichissement des connaissances de la structure de la protéine, ont été appliquées à l'identification des produits de digestion enzymatique de la molécule (GRASSMAN *et al.*, 1960 ; GROSS et NAGAI, 1965) ainsi qu'à ceux que l'on obtenait par la rupture de celle-ci à l'aide de l'énergie ultra-sonore (HODGE *et al.*, 1958). L'application combinée de ces techniques et des

déterminations d'acides aminés N-terminaux et C-terminaux des peptides (S. BUMP *et al.*, 1967) permet de localiser certains acides aminés sur la représentation optique que le microscope électronique donne de la molécule, réalisant ainsi une véritable résolution histochimique à l'échelon moléculaire.

d) PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DU COLLAGÈNE : CARACTÉRISTIQUES DE SOLUBILITÉ

L'accumulation des connaissances sur la structure chimique et physique du collagène n'a été rendue possible que par les travaux qui ont mis en évidence l'existence des formes solubles de la protéine. Ce sont eux qui ont permis d'extraire des tissus animaux des quantités importantes de protéine non dénaturée.

Ces extractions sont basées sur les constatations de GILLETTE (1872), de NAGEOTTE (1927), qui ont montré que le traitement du derme ou de tendons par des tampons de pH acide solubilisait une partie du collagène de ces tissus ; TUSTANOVSKY (1947) est parvenu à purifier et cristalliser la protéine extraite par les tampons acides et peu après, GROSS *et al.* (1955) réalisaient une extraction analogue à froid, à l'aide de tampons neutres de force ionique élevée.

Cet auteur (1958) ainsi que OREKHOVITCH *et coll.* (1952, 1960), ont prouvé par des expériences de marquage de la protéine *in vivo* à l'aide de précurseurs radioactifs que les fractions solubles étaient de synthèse récente ; les fractions acido-solubles sont synthétisées avant les fractions neutro-solubles, et parmi celles-ci, les fractions extraites à force ionique basse sont celles dont la synthèse est la plus récente.

En outre, J. GROSS (1958) a montré que le derme des cobayes jeunes en phase de croissance était particulièrement riche en collagène neutro-soluble. Après une extraction par les tampons neutres et acides, le résidu des tissus n'est plus extrayable que par des solutions alcalines au prix d'une dénaturation de la protéine.

L'extraction séquentielle du collagène des tissus animaux a permis un pas de plus dans la connaissance des constituants de cette molécule : par la chromatographie sur carboxyméthylcellulose (fig. 10) des différentes fractions solubles, il est apparu que l'association deux à deux des peptides α_1 et α_2 se retrouve dans des proportions différentes dans le collagène neutro-soluble et le collagène acido-soluble, ce qui permet de caractériser une fraction, non seulement par sa méthode d'extraction, mais également par sa composition (MARTIN, 1961).

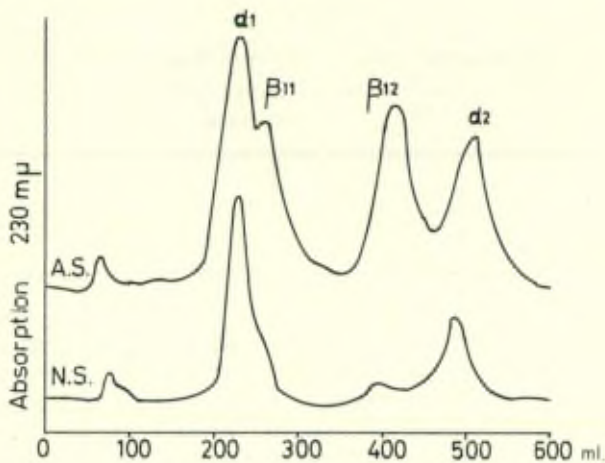


FIG. 10. Comparaison des diagrammes d'élution de collagène de derme de porc dénaturé à 40° C et chromatographié à cette température sur carboxyméthylcellulose.

Tracé supérieur : collagène acido-soluble.

Tracé inférieur : collagène neutro-soluble.

L'axe des ordonnées donne la concentration en protéines exprimée par l'absorption à 2.300 Å.

(Tiré de PIEZ, 1966.)

Il a été possible, grâce à ces techniques, non seulement de préciser les propriétés chimiques du collagène normal (composition en peptides α_1 , α_2 et en leurs agrégats β_{1-1} et β_{1-2}), la composition des peptides en acides aminés — tableau 4 (PIEZ, 1966) mais également certaines de ses propriétés physiques : GROSS *et al.* (1958) ont montré que le chauffage à 37°C d'une solution neutro-soluble de collagène purifié extrait de tissus de vertébrées homéothermes normaux précipitait la protéine de la solution sous la forme d'un réseau anarchique de fibres dont la structure au microscope électronique était identique à celle des fibres naturelles ; lorsque le précipité ainsi obtenu était replongé endéans les trois minutes dans un bain à 0-5°C, près de 90 % des fibres formées se remettaient en solution ; par contre, si la température de 37°C était maintenue plus de soixante minutes, la précipitation devenait irréversible, les fibres cessant d'être neutro-solubles à froid.

Ces différentes notions amènent à considérer que la multiplication des liaisons H — interchaines qui s'établissent entre les peptides α_1 et α_2

TABLEAU 4

Teneur en acides aminés des peptides α_1 , α_2 et β_{1-2}

(Nombre de résidus par mille)

(Tiré de K. PIEZ, 1966)

	$\alpha_1 \pm$ S.E. (a)	$\alpha_2 \pm$ S.E. (a)	$\beta_{1-2} \pm$ S.E. (a)
3-Hydroxyproline . . .	1,2 $\pm$ 0,2	0	0,6
4-Hydroxyproline . . .	94,9 $\pm$ 1,7	84,2 $\pm$ 1,5	90,1 $\pm$ 1,0
Aspartic acid	45,5 $\pm$ 0,3	43,5 $\pm$ 0,2	44,4 $\pm$ 0,2
Thréonine	19,3 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2
Sérine	39,9 $\pm$ 0,4	42,8 $\pm$ 0,4	42,0 $\pm$ 0,3
Glutamic acid	73,0 $\pm$ 0,5	66,0 $\pm$ 0,3	70,3 $\pm$ 0,4
Proline	133,6 $\pm$ 0,6	116,9 $\pm$ 0,4	124,5 $\pm$ 0,8
Glycine	328,6 $\pm$ 1,7	332,2 $\pm$ 1,1	329,9 $\pm$ 1,2
Alanine	110,6 $\pm$ 0,6	102,5 $\pm$ 0,1	106,3 $\pm$ 0,4
Valine	19,1 $\pm$ 0,7	31,3 $\pm$ 1,0	25,1 $\pm$ 0,7
Méthionine	7,8 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,3
Isoleucine	6,5 $\pm$ 0,2	16,4 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,3
Leucine	19,1 $\pm$ 0,2	33,9 $\pm$ 0,3	26,9 $\pm$ 0,3
Tyrosine	2,5 $\pm$ 0,3	3,6 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,2
Phénylalanine	12,1 $\pm$ 0,1	10,4 $\pm$ 0,1	11,3 $\pm$ 0,1
Hydroxylysine	4,1 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,2
Lysine	30,9 $\pm$ 0,4	23,1 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,3
Histidine	2,0 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,1
Arginine	49,6 $\pm$ 0,4	51,1 $\pm$ 0,3	50,2 $\pm$ 0,3
Amide N	(41,7 $\pm$ 1,2)	(41,9 $\pm$ 0,7)	(43,9 $\pm$ 1,0)

(a) S.E. = Erreur Standard.

est un effet du vieillissement de la molécule de collagène et la proportion plus élevée de peptides doublets β_{1-1} et β_{1-2} dans le collagène acido-soluble, comparée à celle qui s'observe dans le collagène neutro-soluble (fig. 10) illustre cette manière de voir.

e) STRUCTURE SUPRA-MOLÉCULAIRE DU COLLAGÈNE NORMAL

D'autre part, les molécules elles-mêmes peuvent contracter entre elles des liaisons différentes afin de former des fibrilles naturelles ou artificielles ; ces liaisons peuvent être des ponts hydrogène comme le suggère Gross dans l'expérience rapportée ci-dessus, ou des liaisons

covalentes (PIEZ *et al.*, 1966) ; ces dernières ont pu être mises en évidence par l'extraction de tissus à l'aide de tampons de guanidine 5 M à pH 7,5 : les extraits ainsi obtenus contiennent des dimères de type $\beta_2-\alpha_2$ (2 peptides α_2) qui ne peuvent provenir que de la rupture de deux liaisons intra-moléculaires dans deux molécules voisines sans que soit rompue la liaison inter-moléculaire qui les unissait (BORNSTEIN *et al.*, 1964).

Ainsi parallèlement aux liaisons interchaines intra-moléculaires s'établissent des liaisons intermoléculaires ; la nature de ces liaisons n'est pas connue avec certitude, pas plus que ne sont connus l'ordre dans lequel elles s'établissent ni leur vitesse : dans certains tissus tels que l'os ou les tissus embryonnaires la quantité très faible de collagène neutro-soluble présente à l'état normal permet de supposer que l'établissement de ces liaisons suit de très près la synthèse du collagène ; rien ne permet d'affirmer cependant que cette particularité soit due à des facteurs externes (présence de polysaccharides dans le milieu extracellulaire par exemple), ou soit inhérente aux caractéristiques chimiques de la molécule de collagène.

2. Microscopie électronique des tissus d'animaux lathyriques

L'application des techniques de la microscopie électronique à l'étude des tissus d'animaux lathyriques a permis de décrire les particularités suivantes :

Au niveau de l'aorte des rats lathyriques (KEECH, 1960) apparaît une hypertrophie de la région subendothéliale et un élargissement de l'espace interlaminaire ; les desmosomes se détachant de la lame élastique et un matériel anhiste s'interpose entre les fibres musculaires lisses ainsi libérées et la lame élastique elle-même. Les fibres de collagène bordant les fibres musculaires peuvent augmenter de diamètre.

Dans le derme des embryons de poulets lathyriques (VAN DENHOOF *et al.*, 1959) les fibres sont disposées de façon moins dense que les fibres des animaux normaux. Toutes les fibres dermiques d'embryons normaux forment des faisceaux dont les diamètres sont très voisins (400-500 Å entre 14 et 17 jours d'incubation), alors que dans le derme lathyrique, la distribution des diamètres des fibres dans un même faisceau est plus étalée (entre 200 et 1100 Å) (fig. 11). Par contre, la périodicité transversale typique des fibres de collagène ne paraît pas altérée.

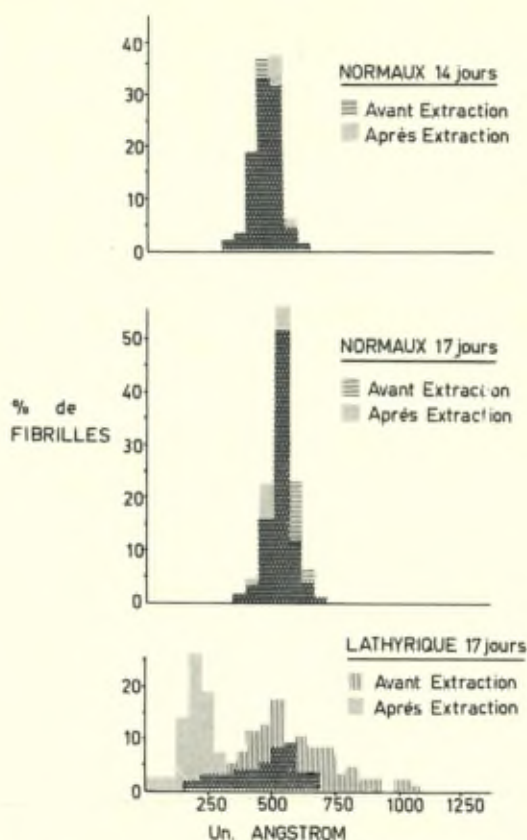


FIG. 11. Distribution des diamètres des fibrilles de collagène observées au microscope électronique dans le derme d'embryons normaux et lathyriques, avant et après extraction.

(Tiré de VAN DEN HOOFF, 1959.)

3. Pathologie moléculaire

LEVENE et GROSS (1959) ont démontré :

1. — Que la fragilité des tissus précédemment décrite dans l'ostéolathyrisme (DASLER, 1954a,b) s'accompagnait de l'apparition précoce d'une forme neutro-soluble de collagène qui normalement n'est pas présente dans le tissu conjonctif ou ne s'y trouve représentée que dans de faibles proportions. Rappelons que la forme neutro-soluble du collagène se caractérise par le petit nombre des liaisons entre les peptides.

2. — Que cette caractéristique physico-chimique de l'intoxication s'installait bien avant tout stigmate morphologique, macroscopique ou microscopique.

3. — Qu'il existait un parallélisme étroit entre la quantité de collagène neutro-soluble extraite du tissu conjonctif lathyrique et la fragilité de ce dernier.

4. — Que le collagène du tissu conjonctif des animaux lathyriques présentait des propriétés différentes de celles du collagène extrait et purifié dans les mêmes conditions à partir des tissus d'animaux normaux. Le collagène extrait des tissus d'animaux normaux par un tampon acide (collagène acidosoluble et collagène neutrosoluble) comprend une proportion importante de combinaisons β_{1-1} et β_{1-2} (fig. 9) ; celui que l'on extrait des tissus lathyriques à l'aide du même tampon est plus pauvre en chaînes doubles et sa composition se rapproche davantage de celle du collagène neutrosoluble normal (MARTIN, GROSS, PIEZ et LEVIS, 1961, fig. 12). Cette différence s'explique par la proportion

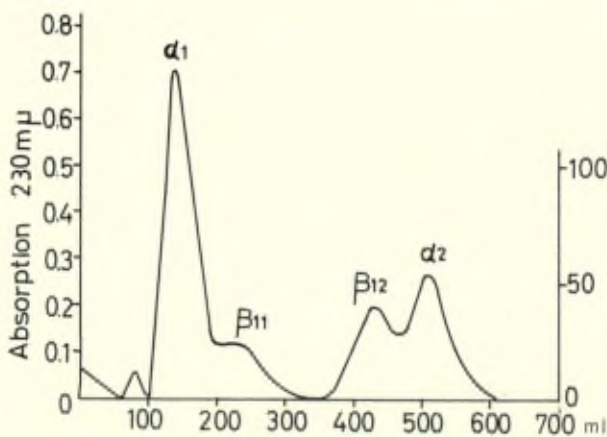


FIG. 12. Schéma d'élution d'un collagène acido-soluble extrait du derme de rat lathyrique.

On y constate une proportion plus faible des agrégats β_{1-1} et β_{1-2} , ce qui le rend plus proche du collagène neutro-soluble normal (cf. fig. 10 à titre de comparaison) ; la séparation est faite sur carboxy-méthylcellulose dans le cas de cette figure également.

(Tiré de MARTIN, 1961.)

importante de collagène neutrosoluble présente dans les tissus lathyriques. Cependant le collagène neutrosoluble lathyrique ne partage pas toutes les propriétés du collagène neutrosoluble normal.

Après chauffage à 37°, le collagène lathyrique en solution dans un tampon neutre précipite en formant un gel dont les fibres qui en constituent le feutrage ont une morphologie identique à celle des fibres normales ; mais ce gel conserve la propriété de revenir en solution aussitôt qu'il est plongé dans un bain à 0-5°C et cela, quelle que soit la durée de chauffage préalable à 37°C (GROSS, 1963) contrairement à ce qu'on observe avec le collagène neutrosoluble normal (GROSS et KIRK, 1958).

Les animaux lathyriques présentent d'autres anomalies biochimiques. Leur calciurie est abaissée. Les cartilages ont une composition ionique altérée : diminution des contenus en Ca, K et P, élévation en Cl et teneur en Na inchangée (BORLE, KARNOVSKY et NICHOLS, 1959). Le taux de phosphatases alcalines de l'os cortical est plus élevé que normalement (ASCHKENASY, 1959). Chez le lapin lathyrique on observe dans les cartilages épiphysaires une diminution des quantités d'hexosamine et d'acide sialique (CASTELLANI et CASTELLANI-BISI, 1958 ; BOLOGNANI et LANERI, 1961).

Les études métaboliques portant sur les produits lathyrogènes marqués au ^{14}C (amino acéto nitrile, AAN et bêta amino propionitrile, BAPN) administrés aux rats indiquent une excrétion maximale de l'isotope par l'urine ainsi que la présence d'une certaine fraction de celui-ci dans l'anhydride carbonique expiré (respectivement 80 et 20 % de la quantité de l'isotope injectée sous forme d'AAN : PONSETI, WAWZONEK *et al.*, 1956) ; lorsque l'intoxication s'effectue au BAPN la fraction d'isotope éliminée par les urines est du même ordre et comprend pour moitié du BAPN inchangé et pour moitié son produit d'oxydation, l'acide cyanacétique (LALICH, 1958). La répartition de la radioactivité dans les divers organes a également été étudiée : STALDER et STEGEMAN (1962) en auraient retrouvé sous la forme de bêta-alanine dans le collagène extrait des os de rats intoxiqués par BAPN. Cependant il a été démontré que ni l'acide cyanacétique ni la bêta alanine ne sont lathyrogènes *in vivo* (LALICH, 1958 ; GROSS, LEVENE *et al.*, 1960).

RÉSUMÉ DE L'INTRODUCTION

L'OSTÉOLATHYRISME est une maladie diffuse du tissu conjonctif faisant suite à une intoxication par des composés chimiques simples.

A un stade précoce, il se caractérise par une fragilité du tissu de soutien allant de pair avec une altération des propriétés physico-chimiques de la protéine qui en est le constituant principal, le collagène.

Cette altération, qui se manifeste par l'apparition de quantités importantes d'une forme neutro-soluble de cette protéine dans les tissus, est caractérisée :

- a) du point de vue chimique par la présence en proportions différentes de peptides α et β dans le collagène lathyrique, comparé au collagène normal ;
- b) du point de vue physique par la propriété que possède un gel de collagène de revenir spontanément en solution dans des tampons neutres froids, quelle que soit la durée d'exposition de ce gel à la température de précipitation. Au contraire, une solution de collagène normal précipitée par exposition à 37° et maintenue à cette température forme rapidement un gel insoluble dans les tampons neutres froids.

A un stade plus tardif, les anomalies morphologiques décrites chez les vertébrés lathyriques se manifestent selon les cas :

- 1. par un trouble de la morphogenèse des embryons qui se traduit par les déformations des fœtus intoxiqués ;
- 2. par un trouble des mécanismes de différenciation tissulaire qui se caractérise par l'existence de zones d'ossification ectopique et leur évolution en volumineux ostéophytes chez les animaux en croissance ;
- 3. par les séquelles de déhiscences musculaires, de dilatations anévrismales, de fractures ou de glissements épiphysaires, subis aux divers stades de l'intoxication.

EXPOSÉ DU TRAVAIL

LE présent travail a pour objet d'étudier les modalités selon lesquelles un agent lathyrogène, le β -aminopropionitrile (BAPN), exerce de façon précoce son effet sur le tissu conjonctif de l'embryon de poulet et en particulier sur la molécule de collagène qui en constitue le composant structurel.

Après l'exposé des méthodes, des techniques et du matériel expérimental utilisés pour ce travail, nous nous appliquerons dans une première partie de celui-ci :

1. A exprimer les paramètres caractérisant la fragilité des tissus et la solubilité du collagène sous une forme qui permette de les suivre dans le temps et d'en comparer l'intensité dans des groupes d'animaux provenant de lots différents ;
2. A vérifier l'existence précoce de modifications biochimiques (apparition de collagène neutrosoluble) et physiques (fragilité) des tissus d'embryons de poulets lathyriques et à décrire de manière quantitative l'évolution de ces paramètres dans le temps et en fonction de doses différentes de BAPN ;
3. A rechercher *in vitro*, l'existence d'un effet de cette substance sur le collagène normal ;
4. A déterminer *in vivo*, l'effet de l'abaissement de la température d'incubation des embryons lathyriques et normaux sur l'accumulation de collagène neutrosoluble et la fragilité des tissus.

Dans une seconde partie de notre étude, nous nous efforcerons de préciser sur quels mécanismes interviennent ces processus métaboliques ; nous envisagerons successivement :

- 1) Le métabolisme du BAPN, dont nous étudierons la distribution et la concentration relative, ainsi que celles de ses métabolites dans les différents tissus de l'embryon ; nous caractériserons ces métabolites

et rechercherons ensuite si le BAPN ou ses métabolites sont incorporés, soit dans la molécule de collagène elle-même, soit dans le réseau cristallin formé par ces molécules agglomérées en fibrilles.

- 2) Le cycle métabolique de la molécule de collagène elle-même, en recherchant si le collagène neutro-soluble est synthétisé de novo après l'injection du BAPN ou si au contraire il provient du remaniement d'un fonds commun de molécules normales insolubles synthétisées et précipitées *in vivo* avant l'injection du lathyrogène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MATÉRIEL

LE matériel utilisé pour le présent travail est l'embryon de poulet de race Livourne blanche (White Leghorn).

Le choix de ce matériel est justifié par les particularités suivantes :

1) La possibilité de provoquer l'intoxication aiguë à l'aide d'une seule injection chez un nombre élevé d'animaux d'expérience requérant une surface d'élevage minimale ;

2) L'intoxication par les lathyrogènes n'exerce pas d'effet sur la croissance des embryons ; au contraire, chez les animaux jeunes, cette intoxication s'accompagne d'inappétence et de perte de poids (GROSS, 1958b) ; si l'on utilisait de jeunes animaux, on devrait donc réduire la nourriture des témoins pour que leur croissance reste parallèle à celle des animaux d'expérience. Une telle préparation des animaux entraînerait notamment une diminution de la quantité de collagène neutrosoluble normal dans les tissus (GROSS, 1958b). L'utilisation d'embryons évite cette manipulation, partant, un paramètre supplémentaire.

3) Contrairement au tissu conjonctif du poussin, du poulet et des jeunes mammifères en période de croissance, celui des embryons de poulet et en particulier de leurs os ne contient que très peu de collagène soluble à pH neutre ; cette particularité augmente les écarts observés entre les animaux normaux et les animaux lathyriques. En outre, il est aisé, dans chaque groupe d'animaux, de garder un lot de témoins permettant d'apprécier la quantité de collagène neutrosoluble que l'on peut extraire des tissus d'animaux normaux.

4) L'anatomie des embryons se prête aisément aux déterminations de l'indice de fragilité des tissus selon la méthode décrite par LEVENE *et coll.* (1959) et modifiée par l'auteur.

II. MÉTHODE

1. Incubation

Les œufs sont incubés à 38,5°C dans des incubatrices à circulation d'air forcée et en atmosphère saturée d'humidité. Sauf en cas d'accident, la mortalité dans ces conditions n'a jamais dépassé 12 % dans les séries les plus défavorables.

2. Injections

Les injections sont pratiquées dans la membrane chorio-allantoïdienne, après transillumination pour repérer les gros vaisseaux et en éviter la blessure.

Sauf dans les expériences où l'on étudie les effets de doses léthales des substances injectées, tous les animaux tués par l'injection ont été rejetés.

Les volumes injectés n'ont dépassé 0,2 ml que dans les cas où plusieurs solutions ont dû être injectées simultanément ; dans ces cas, le volume total n'a jamais été supérieur à 0,4 ml. Pour éviter un reflux par l'orifice d'injection, un trou est percé dans la coquille au niveau de la chambre à air de l'œuf. Le matériel utilisé est stérile ; les solutions sont stérilisées soit à l'autoclave, soit par passage au filtre Millipore.

Après injection, les orifices sont recouverts d'une bande adhésive transparente et les œufs remis à incubation ne sont plus retournés.

3. Mesure de la fragilité des tissus

Des études antérieures (LEVENE *et al.*, 1959) avaient fait usage d'une charge fixe afin de déterminer le temps de rupture de la nuque des embryons et en déduire un indice de fragilité des tissus. L'usage de cette technique de rupture sous une charge constante s'est révélé peu commode par son défaut de souplesse : il s'avérait nécessaire, en effet, de sacrifier un nombre suffisamment important d'animaux, à la seule fin de déterminer la charge qui conviendrait le mieux au groupe considéré ; ce choix une fois fixé, il arrivait souvent que les animaux témoins fussent inexplorables par la même charge que les embryons lathyriques, celle-ci s'avérant trop légère ; ou vice-versa si les témoins avaient servi à déterminer la charge, cette dernière provoquait chez les embryons lathyriques

une rupture quasi instantanée des tissus, rendant impossible toute mesure précise du temps.

Etant donné la nécessité de déterminer la charge optimale pour chaque groupe d'embryons étudiés, il était difficile d'établir des comparaisons entre des groupes d'animaux soumis à des charges différentes sans avoir recours à de nouvelles séries témoins servant d'intermédiaires.

Nous nous sommes donc appliqués à rechercher une méthode mieux adaptée aux besoins d'études comparatives étendues. Un dispositif à charge croissante nous a paru adéquat pour étudier des animaux de fragilité très différente. Il a été réalisé par le système représenté par la figure 13 : de l'eau s'écoule du réservoir R et remplit progressivement un sac en plastique. La fragilité est mesurée soit par le temps qui s'écoule

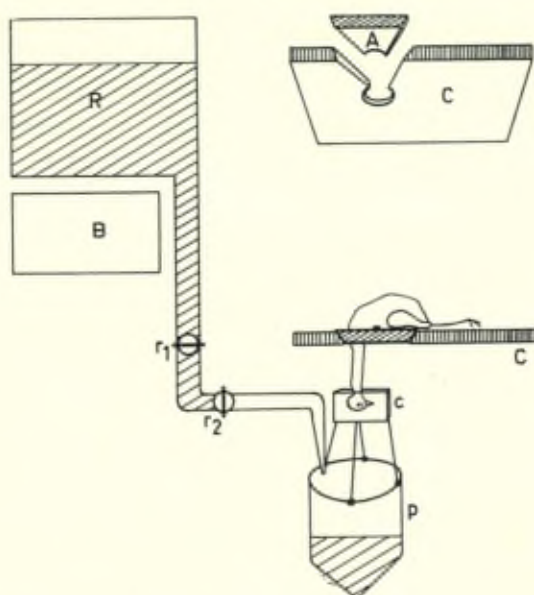


FIG. 13. C : Carcan avec orifice O permettant l'introduction du cou de l'embryon et son maintien en place par la pièce amovible A.

c : Petit carcan formé par une boîte en plexiglass emprisonnant (sans couper les tissus) la tête de l'embryon ; à ce carcan est attaché le sac en plastique (p), souple et léger, dans lequel s'écoule l'eau.

R : Réservoir d'eau ; r1 : robinet tout ou rien ; r2 : robinet réglant le débit.

B : Balance servant à contrôler le volume d'eau s'écoulant en fonction du temps.

entre le début de la mise en charge et la rupture, soit par le poids de la charge de rupture ; celle-ci a été déterminée pour chacun des embryons étudiés et on a aussi calculé le débit du liquide ayant servi à l'établir.

4. Culture d'organes

Lorsque des os d'embryons ont dû être incubés *in vitro* nous avons utilisé les techniques de culture d'organe et les milieux nutritifs décrits par E. WOLFF (1957).

5. Extraction des os et purification du collagène

Après la mesure de l'indice de fragilité, les embryons sont placés dans un récipient maintenu à 5°C. Le collagène est extrait de la façon suivante : les os longs sont disséqués, séparés des cartilages de conjugaison et des tissus mous, coupés en menus morceaux et suspendus dans trois fois leur volume de tampon neutre (NaCl 1 M tamponné par du phosphate de force ionique 0,02, pH 7,6) ; ils sont agités dans cette solution pendant 18 à 24 h., centrifugés à 100.000 g : le précipité est repris dans le même volume de tampon que la première fois et soumis au même cycle.

L'analyse porte sur le premier extrait, ou sur les deux extraits réunis qu'on utilise aussi pour purifier le collagène. Avant analyse ou purification, les extraits sont passés par un fin filtre de verre fritté.

La purification du collagène est obtenue par relargage (addition d'un volume égal de NaCl 4 M) ; le précipité est séparé par centrifugation à 10.000 g pendant 30 min et repris dans un tampon phosphate de pH 7,6 et $\Gamma/2 : 0,4$; il est agité et centrifugé à 50.000 g pendant 60 min ; le collagène contenu dans le surnageant est précipité par dialyse en présence de Na_2HPO_4 (0,01 M) ; centrifugé à 10.000 g pendant 30 min ; ce précipité est dissout dans de l'acide acétique 0,1 M ; à partir de cette solution, les aliquots sont prélevés pour dosage d'hydroxyproline ou lyophilisation.

Dans certains cas, la purification de collagène lathyrique s'est faite par chauffage de l'extrait total à 37° durant 3 h, centrifugation du gel ainsi obtenu et reprise du culot en solution saline froide (1 M NaCl) reprécipitation à 37° puis dialyse du gel ainsi précipité en présence d'acide acétique en solution à 1 %.

Une troisième méthode de purification débute par une dialyse de l'extrait en présence d'eau distillée ; le collagène précipité est séparé par centrifugation et repris dans un tampon phosphate (pH 7,6 ; $\Gamma/2 : 0,4$) ; il est ensuite traité selon la première méthode.

Toutes les opérations d'extraction (depuis et y compris la dissection) et de purification se font à froid (entre 0 et 5°) afin d'éviter la formation de gels de collagène peu solubles ou insolubles qui pourraient apparaître à des températures plus élevées.

6. Isolement et purification des métabolites du BAPN

Les métabolites du BAPN ont été isolés à partir d'homogénats de tissus obtenus après précipitation dans 5 volumes d'acide trichloracétique (ATCA) à 5 % à froid, séparation du précipité par centrifugation et clarification par filtration sur filtres en verre fritté ; l'excès d'ATCA a été éliminé par lavage à l'éther. Les métabolites du BAPN contenus dans la solution ainsi obtenue ont été séparés par chromatographie sur colonne de Dowex 50 $\times$ 8 (H^+) ; l'élution a été obtenue par de l'eau distillée suivie d' NH_4OH 1 M ; certaines fractions ont subi une séparation ultérieure sur colonne de Dowex 1 (formate) éluées à l'eau, suivie d' HCl 1 M.

Une partie des extraits obtenus par l'ATCA et lavés à l'éther n'ont pas été soumis à la chromatographie ; après avoir été concentrés par évaporation et débarrassés de l'excès de sel par électro-osmose, ils ont subi une électrophorèse bidimensionnelle : tampon : pyridine-formate, 0,05 M pH 5,3 ; 300-400 V, 18-22 mA, durée : 12-24 h.

Les fractions isolées par chromatographie sur colonne et électrophorèse à basse tension ont été soumises à une séparation électrophorétique sur papier sous haute tension (2.000 V, 20 min, 6-10 mA à la température du laboratoire en tampon acétate de potassium pH 5,3 et 2,7) ainsi qu'à une séparation chromatographique sur papier à l'aide des solvants suivants : méthanol-pyridine-eau (4 : 2 : 1) et méthyléthylcétone-acide propionique-eau (174 : 57 : 69).

Les marqueurs ont été colorés à la ninhydrine (BAPN, B-alanine) et à l'acide sulfanilique diazoté (ac. cyanacétique et hydracrylonitrile).

7. Séparation de l'hydroxyproline et de la proline

Pour la séparation de l'hydroxyproline et de la proline des hydrolysats de collagène, il a été fait usage soit de la technique de Myhill et

Jackson (1963), soit (à titre qualitatif) de chromatographie en couche mince sur cellulose (couches de 250 μ d'épaisseur) à l'aide du système phénol-eau-NH₄OH 0,7 N (120 : 40 : 2).

Les dosages ont été effectués sur des éluats obtenus par lavage à l'eau bouillante des zones contenant les imino-acides ; la position de ceux-ci a été repérée par des témoins colorés à la ninhydrine (hydroxyproline) et à l'isatine (proline).

8. Dosage de l'hydroxyproline

Les extraits totaux et le collagène purifié sont hydrolysés en tubes scellés, en présence d'un volume égal d'acide chlorhydrique fumant à 138-140°C pendant trois heures.

Les hydrolysats sont additionnés de charbon végétal activé et sont filtrés avant d'être soumis à l'exsiccation sous vide en présence de pentoxyde de phosphore et de pastilles de soude caustique.

Le dosage de l'hydroxyproline sur les hydrolysats a été effectué selon la méthode de NEUMAN et LOGAN (1950) et de l'hydroxyproline obtenue par séparation chromatographique selon la méthode de BERGMAN et LOXLEY (1963).

9. Mesures de radioactivité

Les mesures de radioactivité du BAPN marqué et de ses métabolites, ainsi que du collagène extrait des embryons rendus lathyriques par du BAPN isotopique, ont été effectuées sur planchettes, en prenant soin de n'utiliser que des volumes compris dans la zone de comptage proportionnel afin d'éviter les artefacts par autoabsorption ; dans les cas d'échantillons ayant migré sur papier après électrophorèse ou chromatographie, les bandes de papier ont été découpées en rectangles égaux ; ceux-ci sont fixés sur des coupelles et comptés sur un compteur automatique Nuclear Chicago ; la localisation des pics a été faite sur un passeur de bande 4 II à bas bruit de fond et à enregistrement graphique automatique de marque Vanguard ; ce passeur a été utilisé également pour la détermination des R_f des métabolites du BAPN.

La radioactivité des échantillons d'extraits d'os, de collagène purifié, d'hydroxyproline étudiés après marquage à l'aide d'acides aminés ¹⁴C a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tricarb Packard).

Après mise en solution des substances actives (extraits ou collagène purifié) dans 1 ml d'Hyamine (Packard), les mesures de radioactivité ont été effectuées dans les milieux scintillants suivants :

Pour le Tritium ^3H :

0,200 g de diméthyl POPOP (phénylène-2-2' bis [méthyl-4-phényl-5-oxazole])
6 g de PPO
1 litre de toluène.

Pour le Carbone ^{14}C :

0,100 g de POPOP
4 g de PPO (diphényl-2,5-oxazole)
1 litre de toluène.

Dans le cas des mesures d'activité d'acides aminés isolés par chromatographie, l'Hyamine a été ajoutée au liquide scintillant, après exsiccation de l'éluat d'acide aminé.

Lorsque les séparations étaient effectuées par chromatographie sur couches minces (TLC), les pics radioactifs étaient localisés à l'aide de l'adaptateur spécial du passeur Packard à enregistrement graphique automatique (2 II) ; ils étaient ensuite soit grattés, élués et mesurés comme ci-dessus, soit grattés et versés avec leur support dans les flacons à scintillation. Des essais préalables ont démontré que cette manière de faire ne provoquait pas de diminution de l'efficacité du comptage ; les activités les plus basses enregistrées l'ont été sur un compteur à scintillation Packard pourvu d'un standard externe.

10. Conditions techniques des méthodes d'analyse

Les réactifs utilisés pour la préparation des tampons d'extraction, la précipitation fractionnée du collagène, l'injection des animaux et les différents dosages sont de qualité « pro analysi » ; l'eau des tampons d'extraction à pH constant est une eau distillée et passée sur colonne de résine échangeuse d'ions. Les solvants utilisés pour la chromatographie sur couche mince ou sur papier, pour les comptages en scintillation liquide, ainsi que les scintillateurs 1re et 2re sont respectivement de qualité « pour chromatographie » et « pour scintillation ».

Le matériel de dialyse est en tube de cellophane de marque Visking.

L'agitation en cours d'extraction ou de resolubilisation est une agitation mécanique énergétique par mouvement de va-et-vient ; en cours

de dialyse, elle est obtenue par un agitateur magnétique ou par rotation lente sur plateau tournant incliné.

Le bêta-amino-propionitrile sous forme de fumarate a été gracieusement mis à notre disposition par la firme Abbott (North Chicago, Ill., U.S.A.) et le BAPN marqué au ^{14}C en 1 a été préparé par New England Nuclear (^{14}C -BAPN-HCl, 1,57 mc/mM).

Les séparations électrophorétiques ont été réalisées à l'échelle analytique sur un appareillage de haute tension (2.000 V sur bandes de papier plongeant dans du tétrachlorure de carbone à la température du laboratoire) ; à l'échelle préparative sous 400 V sur l'appareil Elphor semi-préparatif en chambre froide (11°C) ou sur l'appareil préparatif de même marque à circuit de réfrigération, tous deux mis aimablement à notre disposition respectivement par le Pr. M. Glimcher (Mass. Gen. Hosp., Orthopaedic Research Unit) et le Pr. O. F. Schmitt (Mass. Inst. of Techn. Biology Department).

Les comptages ont été effectués soit sur coupelles, soit directement sur bandes de papier : Nuclear Chicago low background thin window automatic gas flow counter, Vanguard 417 Strip counter (^{14}C) soit encore en milieu scintillant (^{14}C et ^3H : Packard tricarb à deux canaux).

Les dosages spectrophotométriques ont été effectués sur spectrophotomètre Beckman DU ou Zeiss ; les centrifugations à grande vitesse sur centrifugeuse préparative Spinco Beckman type L 40 et L 50 ; les déterminations de pH sur pH mètres Beckman, les viscosités au moyen du viscosimètre d'Oswald à constante de temps de 60 secondes dans un bain thermostaté à $5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

La verrerie employée était en verre pyrex.

Le collagène utilisé pour les expériences *in vitro* était soit du collagène acido-soluble extrait du derme de veau normal, soit du collagène neutro-soluble extrait du derme de cobaye, et purifié au laboratoire du Dr Gross selon les techniques décrites par lui-même (GROSS, a).

CHAPITRE I

EFFET DE L'INTOXICATION LATHYRIQUE
SUR LES PROPRIÉTÉS
PHYSICO-CHIMIQUES DU COLLAGÈNE
DE L'EMBRYON DU POULET

AVANT d'investiguer de façon approfondie le mécanisme d'action des agents lathyrogènes, il nous a paru indispensable de vérifier les résultats de la littérature et, si possible, de les exprimer par des paramètres qui permettent une comparaison aisée entre les différents lots d'animaux étudiés.

1. FRAGILITÉ DES TISSUS NORMAUX

Le dispositif à débit constant décrit dans le chapitre des méthodes nous a permis de mesurer la fragilité des tissus d'embryons normaux à différents âges d'incubation.

Notre étude a porté sur un nombre total de 249 embryons normaux répartis en 23 groupes (tableau 5) ; dans le cas d'animaux très fragiles (animaux jeunes pesant moins de 9 g, embryons intoxiqués par de fortes doses de BAPN), il a fallu utiliser des débits d'écoulement plus lents que 2 cc/sec pour pouvoir apprécier avec précision le temps d'écoulement avant la rupture (tableau 5 et 6).

Il devenait utile, dans ces conditions, de voir s'il existait une relation constante entre le poids de l'animal, le temps de rupture des tissus et le débit ; en d'autres termes, de rechercher si la fragilité de l'embryon était fonction du temps de rupture seul ou, en sus de celui-ci, du débit.

S'il existe effectivement une relation constante entre fragilité et débit, il doit être possible d'exprimer la fragilité d'un embryon à l'aide d'un coefficient absolu en effectuant une correction tenant compte de la vitesse d'écoulement du liquide de charge.

Les données obtenues sur les embryons normaux ont été reprises au tableau 5 et soumises à l'analyse statistique (voir Annexe), elles autorisent les déductions suivantes :

La variable indépendante de nos expériences est le temps d'incubation à température fixée ; le poids des embryons (P) évolue en fonction linéaire du temps d'incubation (i) dans la fourchette de temps couverte par nos expériences :

$$P = -28,28 + 2,56 i \quad (19 \text{ jours} > i > 12 \text{ jours})$$

TABLEAU 5

Animaux normaux : poids (en g), charges de rupture (en g),
temps de rupture (en sec)

Les débits ayant servi à établir ces charges de rupture sont de 2,13 ml/sec
sauf pour les cas marqués d'un astérisque

Durée d'incubation Effectif.	15 j. 14			16 j. 10			14 j. 15		
Paramètres	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps
Moyennes	11,4	145	61,3	15,9	362	172,8	9,4	74	31,9
Ecartés étalons . . .	1,95	48,78	21,61	1,62	44,45	27,69	0,83	15,29	5,35
Erreur standard de la moyenne	0,52	13,04	5,78	0,54	14,06	9,23	0,28	3,95	1,38
Durée d'incubation Effectif.	12 j. (*) 9			13 j. (*) 12			14 j. (*) 12		
Paramètres	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps
Moyennes	4,2	16	62	5,4	25	46,0	7,3	58	36,3
Ecartés étalons . . .	0,31	8,10	18,99	0,53	3,45	7,48	0,67	10,78	7,88
Erreur standard de la moyenne	0,10	2,70	6,33	0,15	1,00	2,16	0,19	3,11	2,28
Durée d'incubation Effectif.	16 j. 10			16 j. 10			17 j. (*) 9		
Paramètres	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps
Moyennes	9,7	60	31,9	11,9	163	58,7	15,9	257	161,6
Ecartés étalons . . .	1,14	14,91	8,72	1,07	19,99	10,74	0,91	14,26	34,22
Erreur standard de la moyenne	0,36	4,72	2,76	0,34	6,32	3,40	0,30	15,75	11,41
Durée d'incubation Effectif.	— 13			15 j. 12					
Paramètres	Poids	Charge	Temps	Poids	Charge	Temps			
Moyennes	12,7	115	60,3	14,0	161	79,1			
Ecartés étalons . . .	0,83	36,40	18,66	1,24	29,98	14,46			
Erreur standard de la moyenne	0,23	10,09	5,17	0,36	8,65	5,33			

Durée d'incubation Effectif	15 j. 10	— 7	16 j. 10
Paramètres	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps
Moyennes	14,2 271 239,6	10,1 56 29,8	15,7 293 141,4
Ecartés étalons . . .	1,55 38,03 37,88	0,61 10,07 5,90	0,80 38,05 19,80
Erreur standard de la moyenne	0,47 11,47 11,42	0,23 3,81 2,23	0,25 12,03 6,26
Durée d'incubation Effectif	13 j. 12	14 j. 13	— 10
Paramètres	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps
Moyennes	5,4 28 47,8	10,6 79 35,2	11,2 97 47,2
Ecartés étalons . . .	0,60 3,37 8,26	0,72 10,95 4,57	1,18 28,93 13,94
Erreur standard de la moyenne	0,19 1,02 2,61	0,20 3,04 1,27	0,37 9,15 4,41
Durée d'incubation Effectif	17 j. (*) 7	15 j. 12	17 j. 12
Paramètres	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps
Moyennes	18,8 481 341,4	9,9 76 35,2	15,7 311 161,3
Ecartés étalons . . .	2,29 64,19 86,52	1,41 27,41 13,04	1,56 68,76 44,05
Erreur standard de la moyenne	0,87 24,26 32,70	0,41 8,26 3,93	0,45 18,95 2,72
Durée d'incubation Effectif	16 j. 12	16 j. 9	
Paramètres	Poids Charge Temps	Poids Charge Temps	
Moyennes	12,4 168 83,6	14,8 250 112,2	
Ecartés étalons . . .	1,62 59,21 24,99	1,45 37,56 18,89	
Erreur standard de la moyenne	0,47 14,22 7,21	0,48 12,52 6,30	

Les charges (Ch) nécessaires pour provoquer la rupture des tissus chez les embryons normaux évoluent en fonction du poids des embryons selon une loi exponentielle :

$$\text{Ch} = 7,56 (10^{0,1 P})$$

A poids égal un embryon sera d'autant plus fragile que la charge de rupture est plus faible, ce qui permet de définir un nouveau paramètre : la fragilité (F) en fonction de l'embryon

$$F = 0,05 (10^{-0,1 P})$$

Les poids et les charges (P et Ch) sont exprimés en grammes, les durées d'incubation (i) en jours.

TABLEAU 6

Même tableau que le précédent, groupant les embryons soumis à des charges de rupture établies sous débit à peu près constant (2,13 ml/sec) et donnant la valeur des indices de fragilité correspondants
(calculés selon les données de la littérature)

Nombre d'em- bryons	Poids (moyens) g	Débits moyens et extrêmes ml/sec.		I. F.
15	9,4	2,3	1,82-2,96	13,07
10	9,7	1,92	1,74-2,40	16,85
11	9,8	2,57	1,75-2,55	12,99
7	10,1	1,95	1,62-2,36	17,99
13	10,6	2,24	2,16-2,34	13,52
10	11,2	2,13	2,08-2,16	11,60
14	11,4	2,4	1,95-2,88	9,04
10	11,9	1,94	1,82-2,08	10,76
12	12,4	2,15	1,48-2,83	7,55
13	12,7	2,06	1,85-2,45	11,05
12	14	2,1	1,80-2,45	8,70
9	14,8	2,25	2,06-2,44	6,10
12	15,7	2,16	1,85-2,35	5,19
10	15,7	2,10	2,03-2,18	5,35
10	15,9	2,1	1,79-2,88	4,43
168 au total				

Afin de permettre une comparaison avec les travaux de nos prédécesseurs, nous avons mentionné dans le tableau 6 l'«indice de fragilité» des embryons :

$$\text{I.F.} = \frac{\text{Poids de l'embryon}}{\text{Charge de rupture}} \times 100$$

ainsi qu'il a été défini par LEVENE *et al.* (1959).

Détermination de la variabilité des paramètres caractérisant les extraits d'os d'embryons normaux et lathyriques

a) Afin de disposer d'une valeur de référence significative, nous avons repris les paramètres viscosité relative (*) et contenu en hydroxyproline caractérisant les extraits d'os d'embryons normaux étudiés dans le cours de toutes nos expériences, sans en omettre les valeurs extrêmes, et nous avons soumis ces paramètres à l'analyse statistique (tableau 7) ;

TABLEAU 7

Moyennes, déviations standard et intervalles de confiance des viscosités relatives et des contenus en hydroxyproline des extraits bruts d'os d'embryons normaux

Echantillons	Moyenne	Dévi- ation standard	Intervalle de confiance à 99 %	Nombre de détermi- nations
Embr. 12-13 jours : Viscosité	1,7	0,7	1-4,9	5
Embr. 14-16 jours : Viscosité	1,5	0,1	1,2-1,8	23
Hypro ($\mu\text{g/ml}$ ex- trait)	17	11,4	0-56,9	8

(*) La viscosité relative (η [rel.]) d'un extrait est définie comme étant le rapport entre la durée d'écoulement de cet extrait dans le viscosimètre et la durée d'écoulement du tampon d'extraction.

La viscosité spécifique d'une solution est définie par la grandeur (viscosité relative — 1).

cela nous a permis d'établir les moyennes et déviations standard de ces paramètres pour les embryons normaux.

b) Pour mesurer la quantité de collagène neutro-soluble présente dans les extraits de tissus on peut déterminer soit la viscosité, soit le contenu en hydroxyproline. Comme le montre la figure 14, il existe une excellente corrélation entre ces deux paramètres ($r = 0,897$ et $P < 0,001$). Chacun des douze points y est défini par les mesures effectuées sur les extraits d'un pool d'animaux lathyriques comportant entre cinq et quatorze embryons ; 123 animaux constituent l'ensemble des 12 groupes.

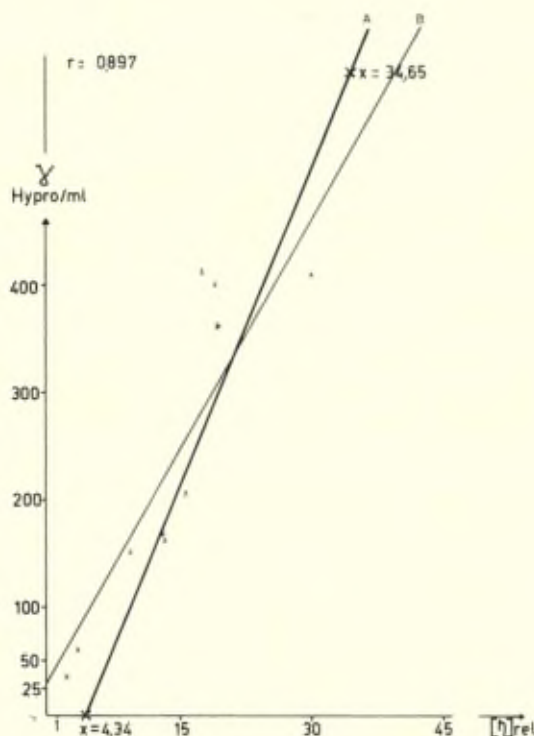


FIG. 14. Corrélation linéaire entre la viscosité relative d'un extrait neutro-soluble d'os d'embryon lathyrique et le contenu de cet extrait en hydroxyproline.

Droite de régression de la viscosité par rapport à l'hydroxyproline (A) pente : 18,1.

Droite de régression de l'hydroxyproline par rapport à la viscosité (B) pente : 14,5.

Coefficient de corrélation : $r = 0,897$ ($P < 0,001$).

2. EFFET DU BAPN SUR LA FRAGILITÉ DES TISSUS LATHYRIQUES ET LEUR CONTENU EN COLLAGÈNE NEUTRO-SOLUBLE

Dans les expériences rapportées dans le paragraphe ci-dessous, nous avons déterminé la concentration en collagène neutro-soluble par la viscosité des extraits d'os d'embryons intoxiqués ; nous avons déterminé parallèlement la fragilité de ces animaux.

Quatorze groupes de 12 embryons ont été répartis en deux lots : les témoins normaux et les lathyriques ; ces derniers ont reçu 1 mg de BAPN, au 12^e jour de l'incubation. Pendant le temps nécessaire aux injections, les œufs devant fournir les embryons témoins ont été soumis, à l'injection près (*), aux mêmes manipulations et aux mêmes variations de température que les œufs d'expérience.

Les 168 œufs ont été réincubés ensemble à 38,5°. Après des délais de 4, 20, 26, 48, 72, 96 et 120 h, on retirait de l'incubatrice un groupe de témoins et un groupe d'œufs injectés. Sur les 84 embryons témoins, 80 sont restés vivants, et parmi les 84 embryons injectés, 65 ont survécu. La mortalité a été beaucoup plus élevée dans un troisième lot dont les œufs avaient été injectés de 15 mg de BAPN chacun ; de ces 84 embryons, seuls 30 animaux ont survécu, dont 24 n'ont pas dépassé les 26 premières heures (tableau 8).

Les indices de fragilité ont été déterminés par des débits de charge liquide très différents à cause de l'écart important des poids (4,2 g pour les embryons les plus jeunes, 15,7 g pour les plus âgés).

Cependant, le même débit a été utilisé dans chaque groupe pour établir l'indice de fragilité des animaux témoins et des animaux lathyriques. Cet indice a été déterminé pour chaque animal séparément et la moyenne du groupe portée au tableau 8. Quant à la viscosité relative, elle a été mesurée sur l'extrait neutro-soluble de l'ensemble des os de tous les animaux du groupe.

La figure 15 représente l'évolution des paramètres dans le temps pour les embryons injectés d'un milligramme de BAPN.

(*) Nous avons pu montrer par ailleurs que l'injection de solution physiologique d'un volume, d'une force ionique et d'un pH identique aux solutions de B.A.P.N. n'exerçait aucun effet sur les propriétés de solubilité du collagène des tissus d'embryons.

TABLEAU 8

Evolution dans le temps de la fragilité des tissus et de la viscosité des extraits neutro-solubles d'os d'embryons normaux (témoins) et lathyriques (après injection de 1 mg et 15 mg de BAPN)

Nombre d'animaux	Dose de BAPN injectée	Durée d'incubation après l'injection	Vitesse d'écoulement en ml/sec.	Poids des embryons g	I.F. : $\frac{\text{Poids}}{\text{Charge}} \times 100$	I.F. Lath I.F. NI	$[\eta]_{sp} =$ $[\eta]_{rel} - 1$	Intervalle de confiance à 99 % pour la $[\eta]_{sp}$
			(moyenne par groupe)					
9	témoin	4 h.	0,3	4,2	26,2	—	0,5	0-3,9
7	1 mg	4 h.	0,3	4,4	29,6	1,13	1,1	
8	15 mg	4 h.	0,2	4,5	62,6	2,39	0,5	
12	témoin	20 h.	0,6	5,4	21,5	—	0,4	
11	1 mg	20 h.	0,5	5,0	100	4,65	2,3	
8	15 mg	20 h.	0,6	5,6	155,3	7,21	4,5	
11	témoin	26 h.	0,6	5,4	19,3	—	0,3	0,2-0,8
8	1 mg	26 h.	0,8	5,3	91,8	4,75	2,7	
8	15 mg	26 h.	0,8	5,4	138,5	7,18	4,0	
12	témoin	48 h.	1,6	7,3	12,5	—	0,5	
7	1 mg	48 h.	1,7	8,5	50,4	4,03	2,6	
12	témoin	72 h.	2,2	9,9	12,9	—	0,6	
11	1 mg	72 h.	1,7	11,8	24,3	1,88	0,8	
12	témoin	96 h.	2,0	12,4	7,4	—	0,6	0,2-0,8
11	1 mg	96 h.	2,4	11,9	11,2	1,51	0,7	
12	témoin	120 h.	1,9	15,7	5,1	—	0,5	
10	1 mg	120 h.	2,3	14,5	7,8	1,53	0,6	

t=0 12^e jour d'incubation
1 mg de β APN

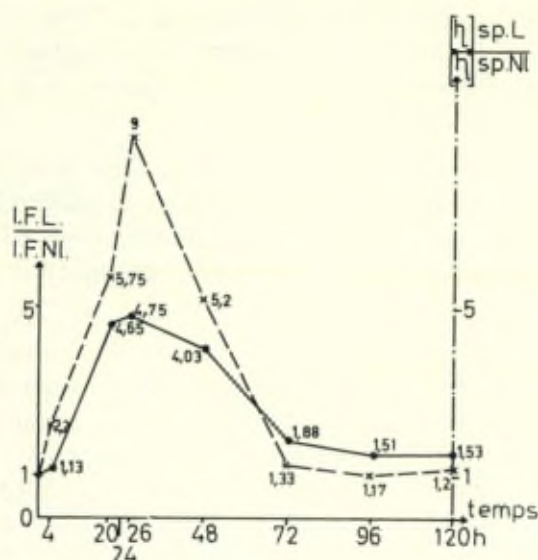


FIG. 15. Evolution de la viscosité des extraits d'os et de la fragilité des embryons lathyriques en fonction du temps après une injection unique de BAPN (1 mg) au 12^e jour d'incubation.

En traits pleins, l'indice de fragilité exprimé par le rapport entre l'indice des embryons lathyriques et celui des embryons normaux.

En traits interrompus, le rapport entre les viscosités spécifiques des embryons lathyriques et normaux.

Il apparaît clairement que ces deux mesures varient parallèlement jusqu'à la 48^e heure qui suit l'injection ; au delà de cette limite la quantité de collagène neutrosoluble redevient normale chez les embryons lathyriques cependant qu'ils restent plus fragiles que les témoins du même âge. La différence de fragilité entre les embryons normaux et lathyriques reste statistiquement significative 120 h après BAPN ($P < 0,05$)

Au début de la période étudiée, le tableau 8 révèle une autre discordance entre la fragilité des embryons et la viscosité de leurs extraits tissulaires. En effet, après un délai de 4 h, la viscosité est plus basse

chez les embryons injectés de 15 mg de BAPN que chez leurs congénères qui en ont reçu un mg ; cependant l'index de fragilité est beaucoup plus élevé chez les premiers.

Il eût été intéressant d'analyser ces phénomènes dans le cours des 4 premières heures qui suivent l'injection de BAPN. La durée des manipulations nécessaires à l'établissement de la fragilité rend malheureusement impossible cette exploration sur le nombre voulu d'embryons durant le court laps de temps disponible.

Mais cette étude est possible en ce qui concerne le collagène. Dans une expérience ultérieure, nous avons déterminé le contenu en collagène neutrosoluble des os chez des embryons plus âgés qui résistent à des doses plus importantes (30 mg de BAPN par embryon au 16^e jour d'incubation).

La figure 16 montre l'augmentation précoce du collagène neutrosoluble par ml d'extrait salin d'os. Dès la quatre-vingtième minute après l'injection de BAPN, la quantité présente dans les extraits a plus que doublé ; cette constatation de l'effet extrêmement précoce du lathyrogène sur les caractéristiques de solubilité du collagène se retrouvera dans des expériences ultérieures ; il nous a paru intéressant d'en rapporter un exemple dès à présent.

B. RELATION ENTRE LA DOSE DE BAPN ET L'INTENSITÉ DE L'INTOXICATION

LEVENE *et al.* (1959) ont démontré que la quantité de collagène neutrosoluble qu'on peut extraire des tissus d'embryons de poulet lathyrique est proportionnelle à la dose de lathyrogène injectée à l'animal. Les conséquences de cette observation nous ont paru suffisamment importantes pour justifier un contrôle expérimental et soumettre ces données à l'analyse statistique.

Nous avons donc incubé trois lots d'embryons ; dans chaque lot, nous avons prélevé un groupe d'embryons témoins et nous avons injecté à trois et quatre autres groupes d'embryons des quantités croissantes de BAPN. Après 48 h d'incubation, les animaux normaux et les embryons lathyriques ont été disséqués et le collagène neutrosoluble a été extrait

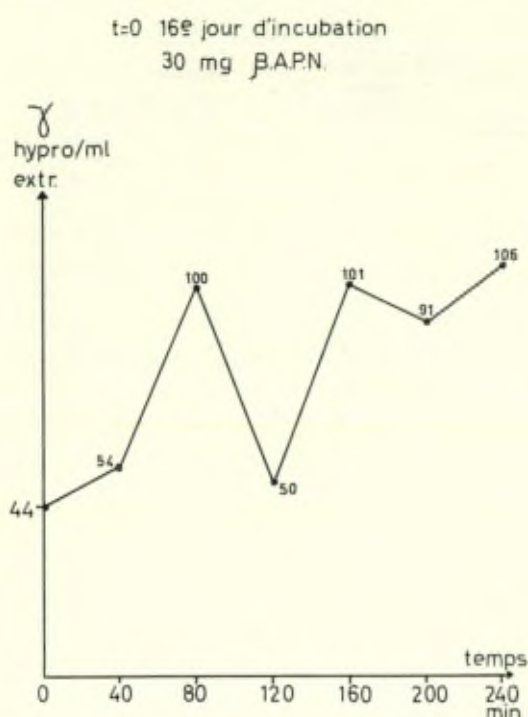


FIG. 16. Evolution du contenu en collagène neutrosoluble d'extraits d'os prélevés sur des embryons lathyriques injectés de 30 mg au 16^e jour d'incubation.

La quantité de collagène est mesurée par la concentration des extraits en hydroxyproline.

de leurs os de la manière habituelle. La teneur des hydrolysats en hydroxyproline nous a servi de paramètre pour mesurer la quantité de collagène neutrosoluble présente dans les extraits (fig. 17).

Le test de covariance démontre que le contenu en collagène neutrosoluble est une fonction linéaire du logarithme de la dose de β -APN, et que les coefficients angulaires des droites obtenues avec chaque lot ne diffèrent pas entre eux de manière statistiquement significative ($P > 0,01$).

Ces constatations nous autorisent à prendre comme mesure de l'intensité de l'intoxication, la quantité de collagène neutro-soluble présente dans les extraits.

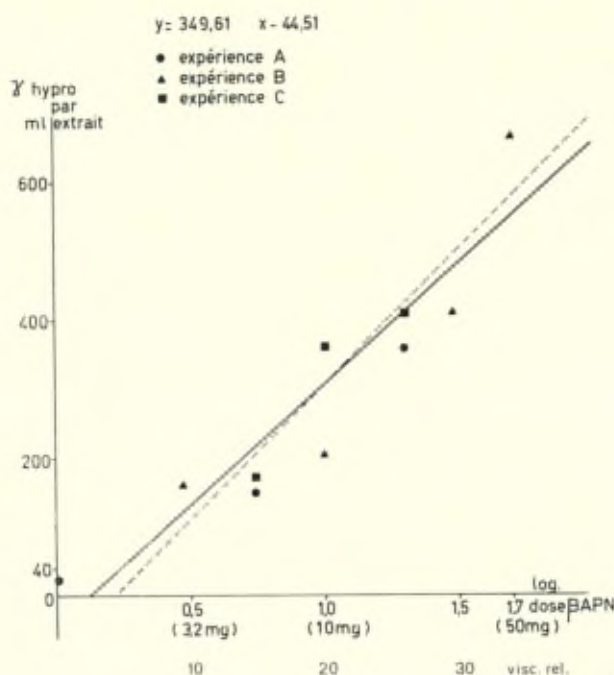


FIG. 17. Concentration en hydroxyproline des extraits neutro-solubles d'os d'embryons lathyriques en fonction du logarithme de la dose de B.A.P.N. injectée 48 h. avant le moment de l'extraction.

En traits interrompus : droite de régression viscosité-hydroxyproline (fig. 14) à titre de comparaison.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

Ces résultats expérimentaux nous permettent de conclure que :

1. La quantité de collagène neutrosoluble présente dans un extrait d'os lathyrique peut s'exprimer indifféremment par la viscosité relative de l'extrait ou sa teneur en hydroxyproline.
2. Le logarithme de la charge nécessaire pour provoquer la rupture du du tissu de soutien des embryons normaux est une fonction linéaire de leur poids, lorsque cette charge est établie à l'aide d'un dispositif à débit constant.
3. Le paragraphe 2 permet en outre de définir de manière absolue la fragilité des tissus de soutien d'embryons d'une espèce déterminée en

fonction de leur poids ; cette caractéristique physique est en effet inversement proportionnelle à la charge de rupture, l'animal étant d'autant plus fragile que la charge de rupture est basse.

4. L'intoxication lathyrique augmente fortement la fragilité des embryons de poulet et le contenu en collagène neutrosoluble de leurs tissus. Une injection unique de BAPN modifie de façon réversible la fragilité des tissus et exerce sur les propriétés de solubilité du collagène un effet directement proportionnel au logarithme de la dose du toxique injecté ; cet effet est également réversible ; il peut être observé dès la 80^e minute qui suit l'intoxication.
5. Les deux paramètres étudiés (fragilité des tissus et quantité de collagène neutrosoluble) ont en général, une évolution parallèle ; cependant la fragilité des tissus d'embryons lathyriques reste élevée après que la quantité de collagène neutrosoluble des extraits est redevenue normale ; il semble donc que les propriétés de solubilité du collagène ne sont pas les seuls facteurs responsables de la fragilité.

CHAPITRE II

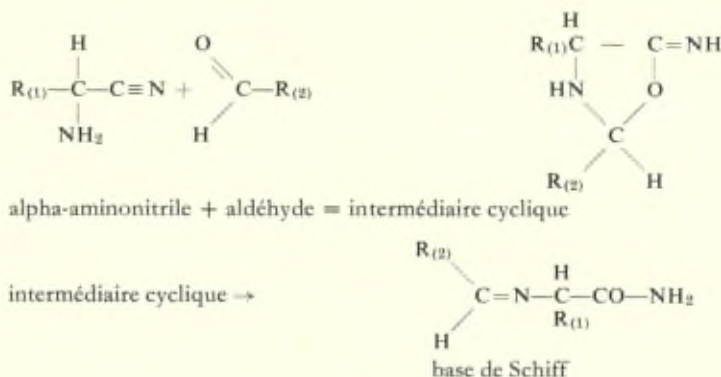


ÉTUDES IN VITRO

A. ÉTUDE DES RÉACTIONS IN VITRO DU COLLAGÈNE AVEC LE BAPN

LA propriété que possèdent les amino-nitriles de réagir en présence de groupements aldéhydes pour former des bases de Schiff pouvaient faire songer à l'éventualité d'une réaction directe entre le BAPN et la molécule de collagène.

Les expériences suivantes pratiquées sur du collagène purifié, sur l'animal mort *in situ* et sur des explants d'os *in vitro* ont pour but d'explorer la possibilité d'une telle réaction.



I. PRÉPARATION DU COLLAGÈNE PURIFIÉ CONVENANT A L'ÉTUDE DE LA RÉACTION BAPN-COLLAGÈNE *IN VITRO*

Les travaux de GROSS sur le collagène purifié ont établi qu'une solution saline à pH neutre préparée à partir de la protéine lyophilisée peut être précipitée par chauffage à 38°C en un fin feutrage anarchique de fibres insolubles dont la structure étudiée en microscopie électronique est identique à celle du collagène présent *in vivo*.

Des gels obtenus selon cette technique ont été réincubés à 38°, en présence de BAPN dans des conditions analogues à la situation *in vivo*.

Après cette deuxième période d'incubation, les gels étaient repris en tampon d'extraction salin froid à pH 7,6, à l'instar de ce qui se fait pour les extractions d'os d'embryons lathyriques.

Nous avons vu précédemment que le capital de collagène d'un organisme n'est pas constitué d'une population homogène de molécules : certaines sont alcali, d'autres acido- ou encore neutro-solubles ; les deux dernières sont extraites des tissus sans subir de dénaturation.

Dans nos premières expériences, nous avons utilisé du collagène extrait des tissus par des tampons neutres, puis précipité, purifié et lyophilisé. Les gels préparés à partir de cette protéine purifiée sont constitués d'un ensemble de molécules provenant d'une population relativement homogène. Mais nous avons constaté que le seul fait d'incuber un gel ainsi obtenu en présence de BAPN (à pH 5,8) suffisait à le dissoudre, tandis que le gel témoin incubé dans une solution saline devenait complètement transparent, d'opalescent qu'il était ; ces deux résultats ont été obtenus sans même qu'il soit nécessaire de reprendre les gels en tampons d'extraction froids après l'incubation ; comme il n'a pas été possible de reproduire point par point la suite des opérations prévue ci-dessus, en utilisant comme matériaux de départ des fibres de collagène provenant de l'extraction à pH neutre de tissus normaux, nous avons renoncé à employer ce matériel dans les expériences ultérieures.

Lorsque nous procédons à une extraction de tissus à l'aide de tampons acides et que nous purifions le collagène ainsi obtenu, la protéine lyophilisée est soluble dans les tampons neutres. Les gels préparés à partir de telles solutions proviennent d'une population hétérogène de molécules acido- et neutro-solubles. Ce défaut d'homogénéité des fibres constituant le gel le rend plus comparable au collagène des tissus des animaux chez lesquels nous avons étudié l'effet des lathyrogènes ; cette préparation convient donc à l'expérience *in vitro* que nous proposons.

2. EFFET DE DIFFÉRENTS PARAMÈTRES SUR LA RÉACTION *IN VITRO* BAPN-COLLAGÈNE

- a) Conditions de pH optimales pour l'incubation en présence de BAPN ;
- b) Concentration en BAPN ;
- c) Durée de chauffage préalable des gels.

a) **L'effet du pH du milieu d'incubation** a été éprouvé dans deux séries d'expériences, différant entre elles par la durée du chauffage préalable et celle de l'incubation (tableau 9)

Les gels incubés en présence de BAPN et soumis à l'extraction par des tampons neutres abandonnent dans le surnageant une quantité appréciable de collagène ; cette quantité est plus importante quand l'incubation s'est faite à pH faiblement acide ; l'échelle de pH n'a cependant pas été étendue plus bas que 5,2 afin de ne pas courir le risque de dénaturer la protéine par l'action conjuguées de la chaleur et de l'acidité. Au moment de l'extraction, le pH est toujours ramené à la neutralité sous l'effet des tampons. Il a été possible dans ces conditions d'extraire d'un gel de collagène insoluble jusqu'à 25 % de la protéine utilisée pour produire le gel.

b) Nous avons étudié l'**effet de concentrations variables** de BAPN sur des gels de collagène purifié obtenus par chauffage préalable durant 8 h à 37°. Le BAPN était dissous dans une solution de chlorure sodique 0,2 M et les gels étaient incubés dans les mêmes conditions, en présence de solutions de chlorure sodique 0,2 M ou de fumarate sodique 0,1 M en solution saline 0,2 M. Dans le tableau 10 les doses de BAPN les plus faibles sont de l'ordre de grandeur des concentrations obtenues par les injections *in vivo*. Ainsi lorsqu'on injecte 20 mg de BAPN sous forme de fumarate à un embryon de 14 jours, on réalise pour un œuf de 60 g une concentration en BAPN (base) de 2,67 mM.

Dans les expériences *in vitro* des doses de BAPN de 0,001 à 0,005 M sont susceptibles de solubiliser du collagène à pH 6,2 ; les effets les plus nets, cependant, ne sont observés que pour des concentrations fortement supérieures : 0,01 et 0,05 M. La viscosité des extraits et leur contenu en hydroxyproline augmentent parallèlement avec la dose de BAPN ; cependant à la concentration de 0,2 M la viscosité est moindre pour une teneur en hydroxyproline plus élevée ; ce résultat discordant n'a pas été soumis à de plus amples explorations car une concentration aussi élevée de BAPN ne se rencontre jamais dans l'expérimentation sur l'animal. On pourrait supposer que dans le cas d'une solution de 0,2 M de BAPN la molécule de collagène subit un début de dénaturation, ce qui aurait pour effet de réduire la viscosité de la solution sans influencer sur sa concentration en hydroxyproline.

c) **La durée du chauffage à 37°** d'une solution en milieu salin neutre de collagène purifié normal est le seul paramètre dont dépende la réversibilité ou la non réversibilité du gel précipité par le chauffage :

TABLEAU 9

Effet du pH du milieu d'incubation (solution saline ou BAPN) sur la solubilité de gels de collagène obtenus par chauffage préalable de 6 h (1^{er} tableau), ou 21 h (2^e tableau)

Les données des deux tableaux sont obtenues à partir d'expériences effectuées sur des solutions stock de collagène de concentrations différentes ; dès lors, les viscosités et les concentrations en hydroxyproline ne peuvent se comparer entre elles qu'à l'intérieur de chaque tableau.

Milieu d'incubation à 37° après chauffage préalable (6 h)			Viscosité du surnageant de l'extrait	
Nature	pH	Durée		
Salin	6	14 h	1,11	
—	6,5	—	1,13	
—	7,2	—	1,12	
BAPN	5,2	—	3,84	
—	6,0	—	3,55	
—	6,5	—	2,38	
—	7,2	—	1,21	
Milieu d'incubation à 37° après chauffage préalable (21 h)			Viscosité du surnageant de l'extrait	Concentration du surnageant en hydroxyproline
Nature	pH	Durée		
Salin	5,8	21 h	1,34	0
—	6,0	—	1,31	—
—	6,2	—	1,38	—
—	6,4	—	1,48	—
—	6,8	—	1,29	—
—	7,0	—	1,29	—
BAPN	5,8	—	10,28	38 µg/ml
—	6,0	—	11,49	42
—	6,2	—	6,92	32
—	6,4	—	6,28	32
—	6,8	—	2,04	28
—	7,0	—	1,39	0

TABLEAU 10

Effet de la concentration en BAPN des milieux d'incubation
in vitro sur la solubilité des gels de collagène

Milieu d'incubation				Surnageants des extraits salins des gels		
Nature	Concentration	pH	Durée	% coll. total	Viscosité relative	µg hypro/ml
BAPN dans NaCl 0,2 M	0,2 M	6,2	15 h	53,5 %	5,47	40
	0,1	—	—	50,5 %	7,97	38
	0,05	—	—	50,5 %	7,07	38
	0,01	—	—	45,5 %	5,29	34
	0,005	—	—	32,5 %	3,77	24
	0,001	—	—		2,62	?
Na fumarate dans 0,2 M NaCl	0,1 M	—	—	8,0 %	1,83	6
NaCl	0,2 M	—	—		1,33	0

pour une brève durée de chauffage, une partie variable du précipité retourne en solution sous l'effet du simple refroidissement (0° à 3°) ; à mesure que la durée du chauffage est plus longue, le précipité forme un gel de moins en moins soluble à froid. Cet effet du temps de chauffage sur la réversibilité des gels s'exprime par une courbe sigmoïde de pente très raide dont le plateau est atteint après 10 minutes de chauffage (GROSS, 1958c, 1963).

Dans les expériences que nous venons de rapporter, nous avons précipité le collagène par des chauffages d'une durée beaucoup plus longue (8 à 21 h). Il nous a cependant paru intéressant de rechercher si la durée de chauffage influençait la quantité de collagène neutro-soluble qu'on pouvait extraire après incubation en présence de BAPN ; nous avons choisi des temps correspondant aux durées d'incubation des expériences *in vivo*.

Dix échantillons d'une solution de collagène purifié ont été précipités par exposition deux par deux à une température de 37° durant 4 à 24 h

(respectivement 4, 6, 8, 10 et 24 h). Après cette période de chauffage préalable cinq des gels obtenus ont été incubés dans du BAPN (sous forme de fumarate) constituant le groupe expérimental ; les cinq autres groupes, servant de témoins, ont été incubés dans une solution de fumarate sodique. Les fumarates de BAPN et de sodium étaient tous deux à la concentration de 0,1 M dans du chlorure sodique 0,1 M tamponné à pH 6 à la température de 37°. Les dix gels y ont séjourné pendant 12 h. Au bout de ce temps, ils en ont été retirés et extraits à froid par le tampon salin neutre habituel.

Les valeurs de la viscosité relative et de la richesse en hydroxyproline des surnageants de la centrifugation des extraits ainsi que le pourcentage de collagène qu'il est possible d'extraire des gels initiaux sont reportés dans le tableau 11.

TABLEAU 11

Effet de la durée de chauffage préalable de gels de collagène
sur leur solubilité après incubation en BAPN

Incubation en 0,1M BAPN (fum.) après chauffage préalable de	Viscosité relative	Hypro µg par ml	% de la quantité de collagène initial
4 h	17,31	105	34,5 %
6 h	15,89	75	24,5 %
8 h	15,05	75	24,5 %
10 h	17,23	85	27,8 %
24 h	20,13	87	30,0 %
Idem : contrôles en fumarate			
4 h	1,24	4	
6 h	1,25	4	
8 h			
10 h	1,21	6	
24 h	1,24	4	

Il en ressort que, dans les conditions où nous sommes placés, la durée du chauffage préalable d'un gel n'exerce pas un effet déterminant sur la facilité avec laquelle il sera possible de dissoudre ce gel en milieu salin froid après incubation en présence de BAPN.

En résumé, ces expériences ont montré que des fibres insolubles de collagène purifié, incubées en présence de BAPN dans des conditions de concentration et pH bien définies peuvent se remettre en solution en tout ou en partie, soit spontanément, soit sous l'effet de tampons d'extractions appropriés. Elles ont permis de reproduire certaines des caractéristiques de l'intoxication *in vivo* ; mais les effets obtenus ne sont nets qu'en présence d'un pH acide et pour des concentrations relatives de BAPN supérieures à celles que réalisent les injections de cette substance aux embryons *in vivo*.

La constatation de ces effets aboutit à poser, sur le plan de la chimie et de la physio-chimie, le problème de l'interaction entre une molécule organique et les diverses formes physiques du biopolymère qu'est le collagène.

Malgré les restrictions qu'apportent à la portée de nos expériences l'utilisation de collagène purifié et la nécessité d'opérer à pH acide, les résultats présentés nous fournissent cependant une première hypothèse de travail : si les modifications de la solubilité du collagène tissulaire de l'animal lathyrique étaient dues, ne fût-ce qu'en partie, à une interaction du type de celle observée *in vitro*, l'incubation, en l'absence de toute activité métabolique, de tissus lathyriques riches en collagène imprégnés de BAPN devrait s'accompagner de la formation de collagène neutro-soluble.

B. INCUBATION IN VITRO DU COLLAGÈNE PRÉSENT DANS DES OS LATHYRIQUES

Les expériences suivantes ont pour but de rechercher si le collagène présent dans les os d'embryons lathyriques subit, lors d'une incubation de ces os *in vitro*, des modifications semblables à celles qui ont été décrites lors de l'incubation de gels de collagène en présence de BAPN. L'imprégnation des tissus en BAPN a été réalisée grâce à une incubation des embryons vivants *in ovo* à 38,5° pendant les deux heures qui suivent l'injection de 20 mg de BAPN, au 14^e jour d'incubation.

Nous avons choisi cette dose parce que nos expériences préliminaires *in vivo* en avaient démontré l'efficacité ainsi que l'innocuité *quoad vitam*.

Les os des embryons disséqués n'ont pas été lavés ni dialysés afin de conserver en place toute la quantité de lathyrogène présente ; ils ont été incubés dans une solution de chlorure sodique à 8,5‰, à raison de 1 ml par gramme d'os. La figure 18 schématise les manipulations auxquelles les œufs ont été soumis. Tous les groupes de six embryons ont d'abord été incubés *in vivo* pendant 2 h après l'injection de BAPN. Les embryons du groupe 1 servant de témoins ont été disséqués après cette période d'incubation. Les autres groupes ont ensuite été répartis en deux lots : pour ceux du premier lot, l'incubation a été poursuivie jusqu'à 4 h, 6 h ou 48 h après l'injection de BAPN et leurs os extraits par un tampon neutre ; le contenu en collagène neutro-soluble a été mesuré par la viscosité relative des extraits. Les embryons du deuxième lot (les groupes 2', 3' et 4') ont été disséqués après 2 h d'incubation *in vivo*, en même temps que les témoins (1) mais leurs os ont été remis à

SCHEMA DES MANIPULATIONS AUXQUELLES SONT
SOUIS LES OEUF DANS L'EXPERIENCE
D'INCUBATION IN VITRO

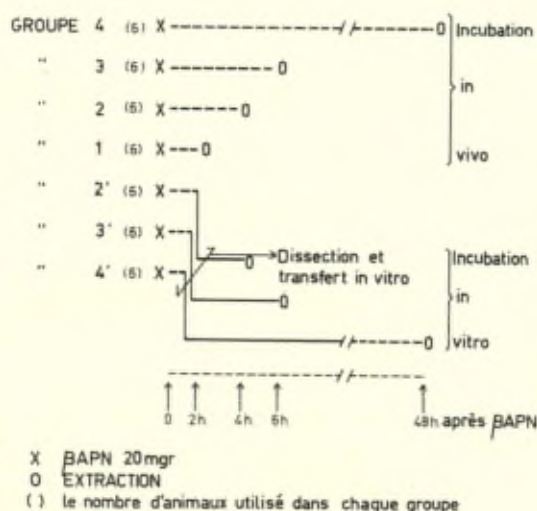


FIG. 18.

incuber *in vitro* pendant les temps respectifs de 2, 4 et 46 h ; ils sont comparés dans le tableau 12 aux groupes 2, 3 et 4 dont l'incubation s'est passée entièrement *in vivo*.

TABLEAU 12

Comparaison entre viscosités d'extraits d'os d'embryons lathyriques incubés selon les indications du schéma de la figure 18

Moments des prélèvements	Modes d'incubation	
	<i>In situ</i> (viscosité relative des extraits)	NaCl 8,5 % <i>In vitro</i> (dissection 2 heures après BAPN) (visc. rel. des extraits)
2 h après BAPN	2,8 (groupe 1)	—
4 h après BAPN	5,4 (groupe 2)	2,0 (groupe 2')
6 h après BAPN	4,3 (groupe 3)	2,5 (groupe 3')
48 h après BAPN	18,8 (groupe 4)	2,4 (groupe 4')

Après les différentes périodes d'incubation d'os lathyriques *in vitro* (2 h, 4 h et 46 h), la quantité de collagène neutro-soluble extraite de ces échantillons n'est pas supérieure à celle qui se trouve présente dans les os au moment de la dissection et du transfert *in vitro*, soit 2 h après l'injection du BAPN.

Au contraire, chez les embryons dont l'incubation a été poursuivie *in vivo*, l'on constate une augmentation de la viscosité des extraits, d'autant plus important que l'incubation a été plus longue.

Nous avons effectué une autre expérience du même type sans modifier la durée d'incubation *in vitro*, mais en présence de divers milieux d'incubation. Les animaux répartis en cinq groupes de 13 embryons ont été injectés de 15 mg de BAPN au 14^e jour d'incubation ; les deux premiers servent de référence : le groupe 1 a été incubé pendant 3 h 30 et le groupe 2 pendant 28 h après l'injection de lathyrogène. Les os des groupes 3, 4 et 5 ont été disséqués à l'issue de 3 h 30 d'incubation *in vivo* (comme pour le groupe 1) puis, après avoir été fragmentés ils ont

été remis à incuber durant 25 h dans les conditions précisées au tableau 13 ; l'usage d'extraits d'embryons dans les groupes 4 et 5 était uniquement justifié par le souci d'apporter au contact des os le BAPN sous la forme où il se trouve présent dans les tissus et pour rencontrer l'objection selon laquelle cette substance diffusant dans le milieu d'incubation ne serait plus présente en quantités suffisantes dans les os du groupe 3.

Les extraits d'os obtenus à l'issue des périodes d'incubation *in vitro* ont une viscosité et un contenu en hydroxyproline voisins de ceux des os d'embryons lathyriques disséqués 3 h 30 après injection de lathyrogène (groupe de référence 1).

Dans cette expérience, comme dans la précédente, seule la poursuite de l'incubation des embryons lathyriques vivants *in situ* permet d'observer un accroissement notable de la quantité de collagène neutrosoluble qu'il est possible d'extraire des os.

TABLEAU 13

Comparaison entre viscosités d'extraits d'os d'embryons lathyriques incubés selon les indications fournies dans la première colonne

Groupes de 13 embryons (à la fin de la dernière période d'incubation, les os sont prélevés en vue de l'extraction selon la méthode usuelle)	Extraits d'os	
	Viscosité relative	Hydroxyproline γ/ml
1. 15 mg de BAPN à 14 j. puis incubation des embryons durant 3 h 30	3,7	60
2. 15 mg de BAPN à 14 j. puis incubation des embryons durant 28 h	19,3	400
3. 15 mg de BAPN à 14 j., incubation de 3 h 30, puis dissection et incubation des os durent 25 h en milieu de Wolff.	3,1	69
4. 15 mg de BAPN à 14 j. incubation de 3 h 30, puis dissection et incubation des os sur milieu salin + extrait d'embryon lathyrique (25 h)	3,6	72
5. Idem., mais le milieu d'incubation ne contient que de l'extrait d'embryon la- thyrique (25 h)	3,0	46

C. COLLAGÈNE INCUBÉ DANS LES EMBRYONS IN SITU

Les conditions d'incubation utilisées dans les expériences précédentes ne permettent pas d'affirmer à coup sûr que toute activité métabolique est absente dans les explants ; en effet, nous avons transplanté des fémurs d'embryons à 10 jours d'incubation sur le milieu optimal de Wolff, et constaté une croissance de longueur de 12 % en 13 jours d'incubation *in vitro* en changeant le milieu selon les indications de l'initiateur de la méthode et en utilisant les conditions de température, d'oxygénation et de ventilation de notre incubatrice ; cependant, une telle croissance représente une activité négligeable pour les périodes de 25 ou 44 h dont nous avons fait usage ; de plus, elle a été mesurée après incubation en milieu optimal et est donc supérieure aux activités en solution saline simple.

Dans le but de répondre de façon plus stricte au critère d'absence d'activité métabolique, et aussi dans le but d'éviter une dilution de l'agent lathyrogène dans le milieu d'incubation, nous avons choisi une autre modalité expérimentale. Les embryons lathyriques sont tués 2 à 4 h après injection de 20 ou 25 mg de BAPN au 14^e jour d'incubation et sont incubés *in toto* pendant 5 à 46 h après le moment du décès ; à l'issue de cette période, ils sont disséqués et leurs os sont extraits de la manière habituelle.

Ce type d'expérience nécessite deux groupes d'animaux de contrôle :

- a) le premier pour montrer que la mort de l'animal normal n'est pas suivie d'une libération massive d'enzymes susceptibles de rendre neutro-soluble le collagène normal ;
- b) le second pour établir la quantité de collagène neutro-soluble présente dans les tissus de l'embryon normal ou lathyrique au moment de l'arrêt de toute activité métabolique.

L'expérience s'est déroulée de la manière suivante (tableau 14) : les animaux incubés vivants sans interruption ont permis de constituer d'une part les groupes de référence n° 1, 2, 3 (normaux incubés durant 4 h et 48 h) et 4 à 10 (lathyriques incubés de 2 h à 48 h après injection de BAPN) ; d'autre part, les groupes 1' et 2' (normaux tués à 4 h d'incubation et réincubés *in toto* pendant 44 h *post mortem*) ainsi que 4', 5', 8' et 9' (lathyriques tués 2 et 4 h après BAPN et incubés de 5 à 46 h *post mortem in toto*) constituent les groupes d'animaux d'expérience incubés

TABLEAU 14

Comparaison entre viscosités d'extraits d'os d'embryons lathyriques incubés selon les indications ci-dessous

Animaux vivants			Animaux incubés <i>post-mortem</i>				
Groupe	Durée totale d'incubation à 38,5°	Viscosité relative extraits	Groupe	Durée d'incubation <i>ante mortem</i>	Durée d'incubation à 38,5° <i>post-mortem</i>	Durée totale de l'incubation <i>in vivo + in vitro</i>	Viscosité relative
Normaux							
1	4 h (8)	1,6	1'	4 h (F) (5)	44 h	48 h	1,4
2	4 h (20)	1,5	2'	4 h (K) (20)	44	48	1,4
3	48 h (15)	1,6					
Lathyriques							
4	2 h (*)	2,8	4'	2 h (K) (*)	5	7	2,2
5	4 h (*)	5,4	5'	2 h (K) (*)	46	48	2,0
6	6 h (*)	4,3					
7	48 h (*)	18,8					
8	4 h (20)	2,5	8'	4 h (F) (5)	44	48	2,0
9	4 h (13)	5,1	9'	4 h (K) (17)	44	48	3,0
10	48 h (16)	19,0					

Les animaux marqués (F) ont été tués par l'exposition au froid, (K) par une injection de KCN. Les chiffres entre parenthèses figurent le nombre d'animaux ayant servi à l'expérience.

(*) Ces données ont été obtenues sur le même lot d'animaux que celui qui a servi à établir le tableau 12, ce qui explique l'identité des valeurs pour ces contrôles dans les deux tableaux.

vivants d'abord et ensuite intacts après avoir été tués par exposition au froid ou par une injection de KCN.

Les résultats, résumés dans le tableau 14, nous ont montré :

1° Animaux normaux

Il n'apparaît pas de collagène neutro-soluble dans les os d'animaux normaux incubés *in ovo* à 38,5° pendant 44 h après avoir été tués par congélation (groupe 1') ou par injection de KCN (groupe 2') ; la viscosité relative des extraits (η [rel] : 1,4) y est la même que celle des groupes 1 et 2 prélevés au même moment où les animaux en expérience sont tués (contrôle *b* ci-dessus) ; elle ne diffère pas non plus de la viscosité des embryons incubés intacts durant la même durée totale d'incubation (contrôle *a* ci-dessus) (groupe 3)

2° Animaux lathyriques

La quantité de collagène neutro-soluble présente dans les extraits d'os d'embryons lathyriques tués 2 à 6 h après l'injection de BAPN confère à ces extraits une viscosité relative de 2,5, 2,8, 4,3, 5,4 et 5,1 (colonne de gauche, les groupes 4 à 6, 8 et 9 constituent les contrôles suggérés en *b* ci-dessus).

Cette quantité n'est pas plus élevée lorsque des embryons lathyriques tués après le même délai sont réincubés morts, *in toto*, durant 5 à 46 h : viscosités relatives : 2, 2,2, et 3,0 (colonne de droite, groupe 4' à 9').

Au contraire, chez les embryons vivants dont l'incubation a été poursuivie jusqu'à 48 h après l'injection de BAPN, on constate une augmentation progressive du collagène neutro-soluble se traduisant par un accroissement de la viscosité des extraits (colonne de gauche, groupes 4 à 10) viscosités comprises entre 2,5 (groupe 8) et 19 (groupe 10).

Il apparaît donc bien que dans ces conditions la production de collagène neutro-soluble lathyrique n'est pas une fonction de la durée de mise en présence du collagène et du BAPN (ainsi qu'il ressort de la comparaison des groupes ayant une même durée totale d'incubation : 6 et 4', 7-5', 10-8' et 9') mais uniquement de la durée de vie des embryons lathyriques.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

De nos expériences sur le collagène purifié, nous pouvons conclure que des fibres insolubles obtenues à partir de cette protéine par chauffage d'une solution à 37°, sont modifiées par l'incubation en présence de BAPN ; lorsque cette incubation a lieu dans des conditions de concentration et de pH bien déterminées une certaine quantité de collagène acquiert des propriétés de solubilité nouvelles : soit celle d'être soluble dans les tampons salins froids à pH neutre, soit même celle d'être spontanément soluble dans le milieu d'incubation à 37°.

Cependant, les concentrations de BAPN nécessaires pour obtenir ce phénomène dans toute son intensité ne semblent pas réalisées *in vivo*.

Les résultats de ces expériences nous ont fourni une hypothèse de travail qui nous a fait rechercher si le collagène *in situ* réagissait à la présence de BAPN de la même façon qu'un gel de la protéine purifiée.

Nous avons pu montrer successivement que du collagène lathyrique n'apparaît que dans les tissus d'animaux vivants et que la quantité de collagène ainsi recueillie est d'autant plus importante que la survie des embryons est plus longue.

Cette démonstration ne préjuge en rien du mécanisme responsable de la formation du collagène lathyrique chez l'animal intact ; il pourrait s'agir indifféremment d'un défaut portant sur la genèse des fibres constituées à partir des molécules nouvellement synthétisées, d'une réaction enzymatique responsable elle-même d'une concentration locale plus élevée en BAPN ou en ions H^+ ou enfin d'une dégradation enzymatique du collagène tissulaire normal lui-même.

CHAPITRE III

**EFFET DU MÉTABOLISME SUR
L'INTOXICATION PAR LE BAPN**

AYANT établi que la quantité de collagène neutrosoluble n'augmente pas en l'absence d'activité métabolique des embryons, il nous a paru intéressant de rechercher s'il existait une relation directe entre le métabolisme de l'embryon et l'apparition de collagène neutro-soluble, et, dans le cas d'une réponse positive à cette question, de tenter de donner une expression quantitative à cette relation.

Plutôt que d'interférer avec l'activité métabolique des embryons par des agents pharmacologiques (inhibiteurs de la synthèse des protéines tels que la puromycine ou l'actinomycine, modificateurs du métabolisme tel que la thyroxine ou ses antagonistes), nous avons préféré ralentir les processus métaboliques en incubant les animaux à basse température. Cette manière d'agir a l'avantage de ne pas introduire dans l'organisme des composés chimiques dont l'effet propre sur la molécule de collagène resterait à élucider.

Il nous fallait démontrer au préalable que l'exposition temporaire à la température extrême que nous avons choisie (25°) permet la survie de l'embryon et la reprise d'une activité métabolique normale dès que l'animal est ramené à sa température d'incubation habituelle.

Bien que nous ayons montré précédemment que l'incubation d'embryons normaux et lathyriques tués par congélation ne modifiait pas le contenu des extraits en collagène neutro-soluble (tableau 14), il nous a paru prudent de vérifier également l'évolution de ce dernier paramètre et de la fragilité chez des embryons incubés et maintenus vivants à basse température.

EXPOSITION AU FROID

A. L'expérience préliminaire a consisté à étudier l'évolution du poids et de l'indice de fragilité d'embryons normaux et d'embryons lathyriques ainsi que du contenu de leurs os en collagène neutrosoluble sous l'effet d'une modification de la température d'incubation.

Tous les animaux d'expérience et les animaux témoins font partie du même lot d'incubation ; les embryons sont répartis en quatre groupes de 26 animaux ; dans chacun d'eux, une moitié servira de témoins,

l'autre moitié (dont chaque individu sera injecté de 20 mg de BAPN par embryon) constitue le groupe expérimental. Dès après l'injection de BAPN - temps 0 - les embryons normaux et les animaux lathyriques seront traités de manière identique dans chaque groupe, et leurs os prélevés et extraits à l'issue des délais indiqués pour chacun des groupes (fig. 19) :

Premier groupe :

4 h d'incubation à 38,5° après le moment de l'injection de BAPN aux animaux lathyriques (temps 0 + 4 h sur la fig. 19).

Deuxième groupe :

4 h après le moment de l'injection de BAPN, les œufs incubés à 38,5° sont transférés à 25°C et incubés 20 h à cette température.

Troisième groupe :

Même traitement que le précédent, mais à l'issue de la période d'incubation à 25°C, les œufs sont ramenés pendant 4 h à 38,5°C.

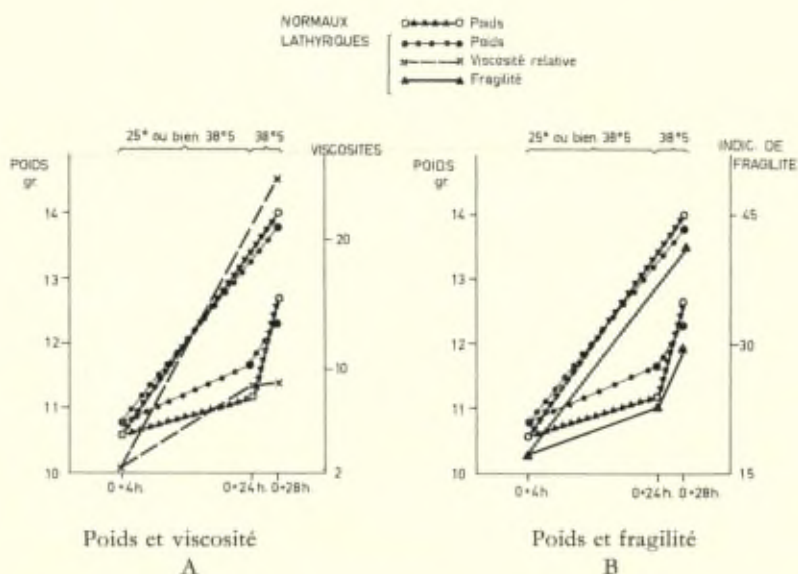


FIG. 19. Evolution graphique de la viscosité d'extraits d'os (A), du poids et de l'indice de fragilité (B) des embryons normaux et lathyriques en fonction du temps, lorsqu'on fait varier la température d'incubation.

TABLEAU 15a

Evolution des poids d'embryons lathyriques et normaux incubés à températures différentes,
valeurs des charges de rupture et des viscosités des extraits d'os des différents groupes

	I 4 h à 38,5°	II 4 h à 38,5° + 20 h à 25°	III 4 h à 38,5° + 20 h à 25° + 4 h à 38,5°	IV 4 h à 38,5° + 24 h à 38,5°
Poids (en g) :				
Normaux	10,6 [0,20] (10)	11,2 [0,38] (10)	12,7 [0,23] (13)	14,0 [0,36] (12)
Lathyriques	10,9 [0,31] (10)	11,5 [0,41] (10)	12,3 [0,29] (12)	14,1 [0,49] (13)
Fragilité :				
<i>Normaux</i> (charges de rupture en g)	79,1 {86,8}	100,4 {92,7}	133,3 {140,8}	151,8 {(189,9)}
<i>Lathyriques :</i>				
a) (charges de rupture)	65,4 {93,0}	51,1 {107,8}	46,2 {128,4}	44,0 {194,3}
b) (% de la charge prévue pour des embryons normaux de même poids)	70,3	47,4	35,9	22,3
c) (indice de fragilité selon LE- VENE <i>et al.</i>)	17,0	23,0	29,6	41,8
[η]rel.				
Lathyriques	2,4	8,9	9,2	24,8
Normaux	1,5	± 0,1	(cf. tableau 7)	

Entre parenthèses () le nombre d'embryons dans chaque groupe.

Entre crochets [] valeur de l'erreur standard de la moyenne.

Entre accolades { } charges calculées en fonction du poids de la moyenne (cf. Annexe).

Quatrième groupe :

Incubation à 38,5°C durant les 28 h qui suivent le moment de l'injection de BAPN.

Les résultats de cette expérience sont schématisés par la figure 19 et repris dans les tableaux 15a et 15b :

1^o) Un abaissement de la température d'incubation de 38,5° à 25° pendant 20 h permet une faible croissance pondérale des embryons : + 6 % (tableau 15b ; II — I).

2^o) Lorsque ces embryons, préalablement refroidis, sont remis à incuber à la température normale (38,5°) leur croissance redevient très active : leurs poids atteignant en 4 heures des valeurs (III) nettement supérieures aux valeurs de départ (I) et les différences de poids observées (III — I) sont significatives à un niveau dépassant 1 % (tableau 15b) pour les normaux aussi bien que pour les lathyriques. Le poids final reste cependant inférieur à celui des animaux incubés à 38,5° sans interruption (IV — III).

3^o) La viscosité des extraits bruts d'os d'embryons lathyriques incubés sans interruption à 38,5° (IV - tableau 15a) est 24,8 ; elle

TABLEAU 15b

Comparaisons des poids d'embryons et des charges de rupture
pour des incubations à températures différentes

	II — I	III — I	IV — I	III — II	IV — III
Poids :					
Normaux	+ 6 % P > 0,05	+ 19 % P < 0,01	+ 32 % P < 0,01	+ 13 % P < 0,01	+ 10 % P > 0,05
Lathyriques	+ 6 % P < 0,01	+ 13 % P < 0,01	+ 29 % P < 0,01	+ 7 % P < 0,01	+ 15 % P < 0,01
Fragilité :					
Lathyriques charges	— 22 %	— 29 %	— 33 %	— 10 %	— 5 %
Normaux charges	+ 27 %	+ 68 %	+ 92 %	+ 33 %	+ 14 %

atteint seulement 9,2 pour les embryons dont la température d'incubation a été abaissée à 25° pendant 20 h (III), une telle différence correspond à celle que l'on observe entre des embryons soumis respectivement à des injections de 3 et de 20 mg de BAPN (cf. fig. 17).

4°) Chez les embryons lathyriques incubés à 38,5° l'indice de fragilité a augmenté en 24 heures de 17 à 41,8. Lorsque l'incubation s'est faite pendant 20 h à 25° et 4 h à 38,5°, l'indice de fragilité n'atteint que 29,6 (groupe n° III).

L'ensemble de ces données répond à la première question que nous nous étions posée : elles établissent que l'exposition temporaire au froid d'embryons lathyriques ou normaux, tout en ralentissant leur croissance, autorise la reprise d'une activité métabolique intense dès le retour à une température normale. Cette activité métabolique est telle, que le poids des animaux soumis au refroidissement se rapproche de celui des embryons incubés à 38,5° sans interruption. De plus l'apparition de collagène neutro-soluble dans les extraits d'os lathyriques est déprimée en même temps que la croissance est ralentie.

B. Relation entre l'abaissement de la température d'incubation et la sévérité des altérations provoquées par l'intoxication

L'expérience entreprise dans le but d'établir cette relation a consisté à injecter le BAPN (20 mg par embryon) à un lot d'animaux au 13^e jour d'incubation puis à les incuber durant 4 h à 38,5°C. Les embryons ont été répartis en 4 groupes ; les animaux du premier groupe (témoin) ont été tués 4 h après BAPN et leurs os disséqués et extraits ; au même moment, les animaux des trois autres groupes ont été mis à incuber pendant 20 h à des températures de 25°, 31° et 38,5° (fig. 20).

Après ce laps de temps, les embryons ont été prélevés, pesés et disséqués.

Les 3 derniers groupes comprenaient 20 embryons au départ ; le groupe témoin disséqué 4 h après injection de BAPN en comprenait 25 afin de disposer d'une quantité d'os suffisante, le poids des embryons étant nettement inférieur à celui des animaux qui devaient être disséqués 20 h plus tard.

De plus, 75 animaux normaux prélevés sur le même lot et répartis en 4 groupes ont été soumis aux mêmes conditions, afin de fournir par les variations de leurs poids, un élément de contrôle supplémentaire sur les conditions d'incubation.

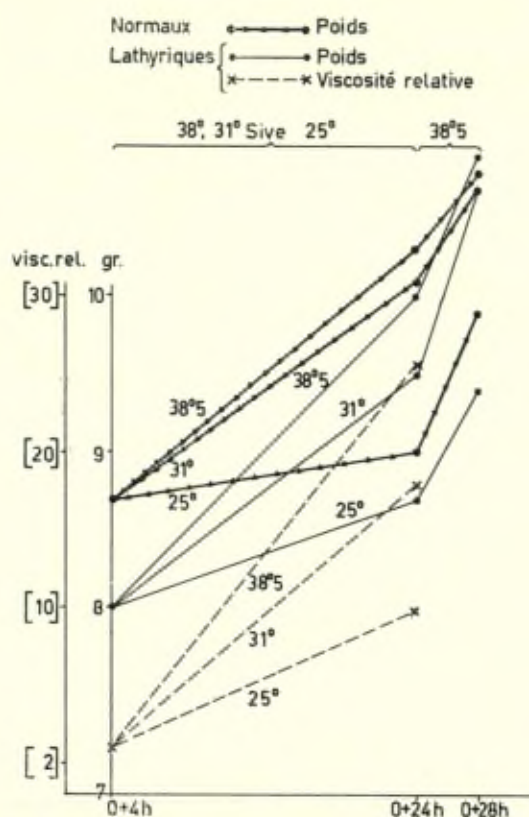


FIG. 20. Evolution graphique de la viscosité d'extraits d'os lathyriques et du poids des embryons en fonction du temps lorsqu'on fait varier la température d'incubation.

Le tableau 16 détaille l'analyse des résultats ; il montre que la croissance est d'autant plus ralentie que la température d'incubation est basse ; cependant la différence observée entre les poids des embryons incubés à 38,5° et à 31° (groupe IV - III) n'est pas statistiquement significative.

L'incubation d'embryons lathyriques à une température inférieure à 38,5° s'accompagne d'une production décruée de collagène neutrosoluble d'autant plus marquée que la température d'incubation est plus basse.

TABLEAU 16a

Evolution du poids et de la viscosité relative
des extraits d'os lathyriques d'embryons
maintenus à trois températures d'incubation différentes

(Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs de l'erreur standard de la moyenne)

	I	II	III	IV
	4 h à 38°	4 h à 38° + 20 h à 25°	4 h à 38° + 20 h à 31°	24 h à 38°
Poids :				
Normaux (g)	8,7 (0,18)	9,2 (0,18)	10,3 (0,40)	10,5 (0,26)
Lathyriques	7,7 (0,17)	8,9 (0,29)	9,7 (0,25)	10,2 (0,29)
[η] rel. :				
Normaux		1,7 ±	0,7 (cf. tabl. 7)	
Lathyriques	2,9	11,9	20,0	27,6

TABLEAU 16b

Comparaison des poids d'embryons pour des incubations à températures
différentes

	IV — I	III — I	II — I	III — II	IV — II	IV — III
Poids normaux	21 % P < 0,01	7 % P < 0,01	5 % P < 0,05	13 % P < 0,01	15,4 % P < 0,01	2 % P > 0,05
Poids lathyriques	34 % P < 0,01	28 % P < 0,01	17 % P < 0,01	9 % P > 0,05	14,4 % P < 0,01	5 % P > 0,05

On observe donc au sein des groupes incubés à différentes températures pendant 20 heures un rapport presque constant entre les deux paramètres : l'activité métabolique (augmentation de poids) et l'intensité de l'intoxication, cette dernière étant exprimée par l'élévation de la quantité de collagène neutro-soluble des extraits (viscosité relative) (tableau 17).

TABLEAU 17

Comparaison des accroissements de poids d'embryons lathyriques aux accroissements de viscosité relative d'extraits de leurs os après incubation dans différentes conditions

Groupes comparés	Températures d'incubation étudiée	Viscosité	Poids	$\frac{\Delta \text{ viscosité}}{\Delta P}$
IV - I (tableau 16 b)	38°	830 ‰	34 ‰	24,4
III - I (idem.)	31°	590 ‰	28 ‰	21,1
II - I (idem.)	25°	310 ‰	17 ‰	18,2
III - I + + + + . (tableau 15 b)	25°	283 ‰	14 ‰	20,2

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

L'incubation d'embryons lathyriques à des températures inférieures à 38,5° nous a permis de montrer :

- A. 1. que cette manipulation permet la survie des animaux lorsqu'ils sont remis à incuber à la température habituelle ;
2. qu'à l'issue de cette modification transitoire des conditions d'incubation, il se forme moins de collagène neutrosoluble dans les os et que cette diminution s'accompagne d'une fragilité moindre des tissus ;
- B. qu'il existe un rapport constant entre l'activité métabolique des embryons lathyriques et la quantité de collagène neutrosoluble présente dans leurs tissus.

CHAPITRE IV

**MÉTABOLISME DE BAPN ET
MÉTABOLISME DU COLLAGÈNE EN
PRÉSENCE DU BAPN**

INTRODUCTION

AYANT montré que l'apparition de collagène neutrosoluble lathyrique *in situ* ne progresse pas en l'absence d'activité métabolique et dépend quantitativement de l'intensité des processus métaboliques généraux, nous avons à déterminer les modalités selon lesquelles interviennent ces processus.

Nous devons d'une part étudier le circuit métabolique de la molécule de BAPN dans l'embryon lathyrique : rechercher la concentration relative de cette substance dans les différents organes des embryons, dans les tissus riches ou pauvres en collagène ou dans les fibrilles qu'elle forme, et enfin, tenter de déterminer si le ou les métabolites nouveaux du BAPN que nous réussirions à mettre en évidence exercent un effet lathyrogène *in vivo*.

D'autre part, il fallait envisager le métabolisme de la molécule de collagène elle-même et préciser si le phénomène observé *in vivo* correspond à l'altération, sous l'effet d'un processus métabolique, des propriétés de solubilité d'un collagène insoluble normal préexistant au moment de l'intoxication ou bien, au contraire, si la modification due au BAPN se produit au fur et à mesure de l'apparition de molécules de collagène fraîchement synthétisées.

A. LE MÉTABOLISME DU BAPN

Exposé des recherches

Nous envisagerons en premier lieu les voies métaboliques empruntées par le BAPN et étudierons successivement :

1. La concentration relative du BAPN (et de ses métabolites) dans les différentes structures de l'œuf et les tissus de l'embryon, en précisant la nature de ces métabolites et en recherchant leur effet lathyrogène éventuel.

2. Le collagène extrait d'embryons lathyriques afin de déterminer si la molécule elle-même ou le réseau cristallin qu'elle forme a incorporé du BAPN ou un de ses métabolites.

Ces études seront menées à l'aide de BAPN marqué en position 1 par du carbone radioactif.

Exposé des résultats

1. *Métabolisme du BAPN*

(Isolement et caractéristiques des métabolites)

La mise en évidence de la radioactivité a été étudiée dans les différentes structures des embryons 4 et 24 h après une injection de BAPN marqué.

Nous avons porté notre attention sur la fraction libre, non liée aux protéines en précipitant ces dernières par l'acide trichloracétique (ATCA, cf. Techniques) ; les surnageants des précipitations étant lavés à l'éther afin de les débarrasser de l'ATCA, nous avons recherché également si le lavage éliminait une fraction notable de la radioactivité totale.

Les données se rapportant à la répartition de la radioactivité en fonction du temps et de la localisation anatomique sont reprises dans le tableau 18 ; comme on pouvait s'y attendre, le pourcentage de radioactivité que l'on trouve dans les structures extra-embryonnaires 24 h après l'injection de BAPN est moins élevée que celle que l'on décèle chez les animaux sacrifiés 4 h après avoir reçu du BAPN ; on note en outre l'absence de concentration de la radioactivité dans le foie 24 h après le début de l'intoxication.

Au cours de l'étape suivante, nous avons étudié la répartition des substances responsables de la radioactivité avant d'en tenter l'isolement.

Les figures 21 à 23 représentant les types de courbes que l'on obtient après passage sur Dowex 50 des surnageants de la précipitation par l'ATCA des homogénats provenant d'embryons entiers (fig. 21), d'embryons sans le foie (fig. 22), de foies d'embryons (fig. 23) et de structures extra-embryonnaires (fig. 24), d'animaux sacrifiés 24 h ou 48 h après l'injection de BAPN. Ces profils partagent la caractéristique commune de présenter un pic élué à pH acide et un pic élué à pH alcalin ; le premier est suivi d'une trainée (fig. 21 et 24) ou même d'un second pic plus petit (fig. 22 et 23) ; le pic alcalin est suivi lui aussi d'une trainée (fig. 24) ou d'un pic secondaire (fig. 21, 22 et 23). Lorsque

TABLEAU 18

Distribution globale de la radioactivité

Fractions d'homogénats précipités au T. C. A.	Comptes totaux/min				Radioactivité exprimée en pourcentage de la radioactivité injectée			
	Embryons				Embryons			
	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4
1. Radioactivité totale injectée . .	8,50.10 ⁶	8,50.10 ⁶	8,50.10 ⁶	8,50.10 ⁶	100	100	100	100
2. Structures et liq. extra-embryon- naires	6,70.10 ⁶	7,23.10 ⁶	3,29.10 ⁶	4,95.10 ⁶	78,82 %	85,06 %	38,71 %	58,23 %
3. Embryon sans le foie	0,25.10 ⁶	0,37.10 ⁶	0,94.10 ⁶	1,03.10 ⁶	2,93	4,12	11,06	12,12
4. Foie	0,02.10 ⁶	0,02.10 ⁶	0,02.10 ⁶	0,02.10 ⁶	0,24	0,24	0,24	0,24
5. Pool des lavages à l'éther des surnageants de la précipitation de 2 à 4	0,13.10 ⁶	0,05.10 ⁶	—	—	1,43	0,59	—	—
6. Radioactivité totale récupérée .	7,10.10 ⁶	7,67.10 ⁶	4,23.10 ⁶	5,98.10 ⁶	83,40	90,03	50,01	70,59
7. Non récupéré (*)	1,40.10 ⁶	0,83.10 ⁶	—	—	16,60	9,07	—	—

Embryons n° 1 et 2 injectés à 14 jours de 25 mgr de BAPN + 20 μ C ¹⁴C-BAPN ; dissection 4 h après l'injection ; n° 3 et 4 injectés à 13 jours de 20 mg de BAPN + 20 μ ¹⁴C ; dissection 24 h après l'injection.

(*) Lorsque des œufs injectés de ¹⁴C-BAPN ont été incubés dans un appareillage permettant de récupérer l'anhydride carbonique, il n'a pas été possible de mettre en évidence de précipité de ¹⁴CO₂ Ba après 24 h d'incubation dans les conditions habituelles.

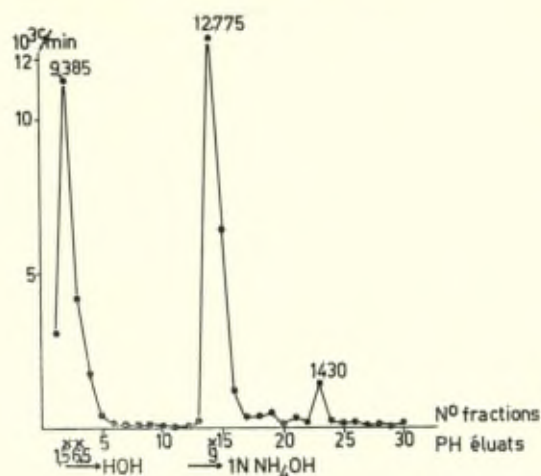


FIG. 21. Embryon (entier) 48 h. après BAPN.

Surnageant ATCA lavé à l'éther.

Colonne : 5 ml Dowex 50 H^+ $\times$ 8.

Fractions : 7 ml.

Volume des échantillons aliquotés sur les coupelles de comptage : 200 μ l.

le pic acide est fractionné sur une résine anionique (Dowex I), il se résout en 2 composants nettement séparés (fig. 25).

Le tableau 19 permet d'apprécier quantitativement les proportions de substances recueillies à partir des différents éluats : la répartition de la radioactivité est très semblable dans les éluats de foie et dans les éluats d'embryons sans le foie ; cette constatation nous a autorisé à ne plus disséquer cet organe séparément dans les expériences suivantes.

Lorsque l'incubation des embryons lathyriques se prolonge jusqu'à 48 h, les homogénats des corps s'appauvrissent en fraction basique et s'enrichissent en fraction acide.

Les données qui précèdent ne nous renseignent guère sur la distribution de la radioactivité au sein des tissus riches en collagène ; afin d'y relever l'activité non liée aux protéines, nous avons étudié le dialysat des extraits neutres d'os lathyriques prélevés sur des embryons intoxiqués depuis 48 h (fig. 26) ; nous y avons retrouvé les mêmes caractéristiques

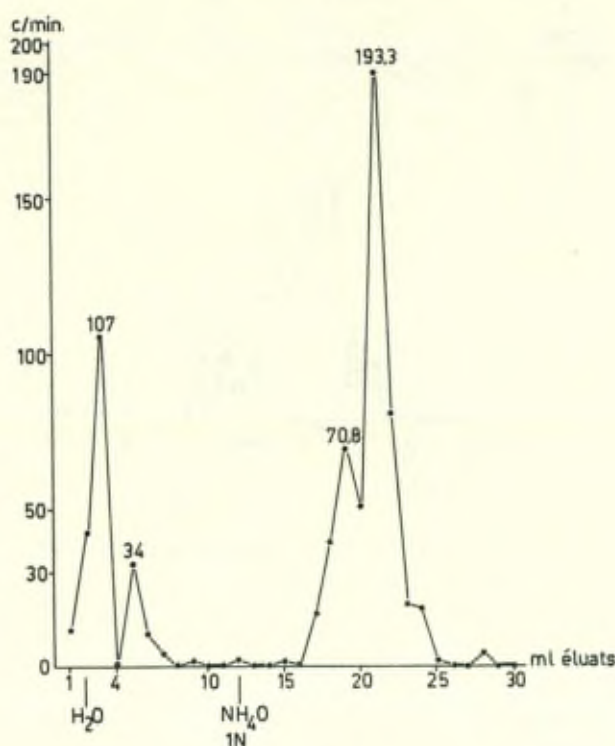


FIG. 22. Elution du liquide surnageant provenant de la précipitation par l'ATCA d'un homogénat du corps de l'embryon C (Tabl. 18: embryon sans le foie).

Colonne : 2 mL Dowex 50 H⁺ × 8

Fractions : 1 mL.

Echantillons comptés sur coupelles : 25 µL.

qualitatives que dans les autres tissus. Il convient de remarquer ici que les valeurs relatives des pics montrent une distribution des métabolites semblable à celle qui est présente dans les éluats provenant des différents tissus examinés et des homogénats d'embryons entiers, ce qui permet de conclure que les os, riches en collagène, ne concentrent pas électivement, à l'état libre, ni le BAPN, ni ses métabolites.

Faisant appel aux techniques de séparation par électrophorèse décrites au chapitre des méthodes, nous avons fractionné les éluats des colonnes

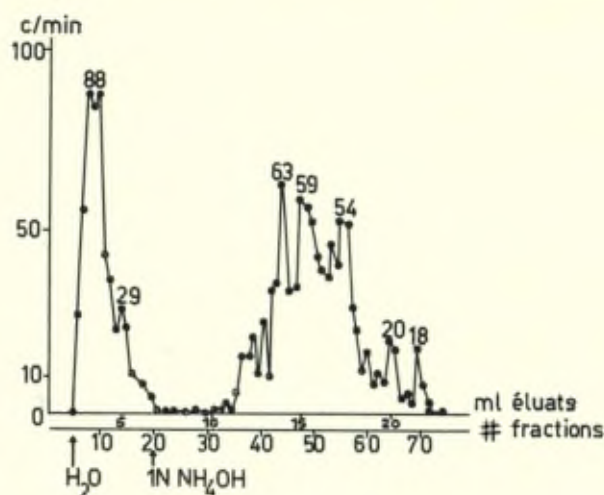


FIG. 23. Embryons C.D.E. (foies) 24 h. après B.A.P.N.

Préparation et colonne idem figure 21.

Fractions : 0,27 ml.

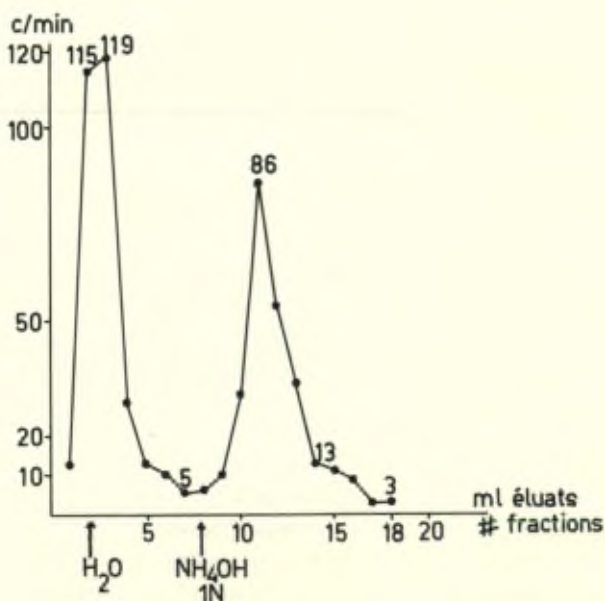


FIG. 24. Embryon C (structures extra-embryonnaires) 24 h. après B.A.P.N.

Préparation, fractionnement, idem figure 21.

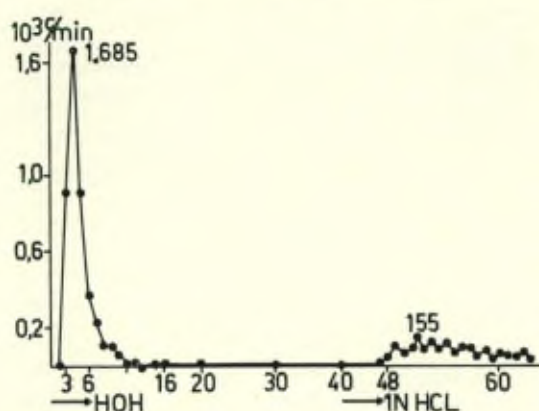


FIG. 25. Embryon entier (48 h.).

Fractions 1 + 2 éluées sur Dowex 50 (fig. 21).

Colonne : Dowex I (Formate⁻), volume : 10 ml.

Fractions : 1 ml.

Volume des échantillons comptés : 200 μ l.

TABLEAU 19

Représentation quantitative des données
fournies par les courbes d'éluion des figures 21 à 24

Fraction étudiée	Embryons sans le foie (24 h)	Embryons entiers (48 h)	Foies (24 h)	Structures extra-embryonnaires (24 h)
Pic d'éluion acide	20,6 % (6.512 c/m)	44,8 % (20.488 c/m)	32,4 % (5.150 c/m)	44,5 % (9.360 c/m)
Pic d'éluion neutre	5,8 % (1.832 c/m)		2,2 % (351 c/m)	
Pic d'éluion basique	63,0 % (19.880 c/m)	44,6 % (20.395 c/m)	58,5 % (9.303 c/m)	36 % (8.200 c/m)
Radioactivité totale élue	(31.512 c/m)	(42.353 c/m)	(15.887 c/m)	(22.552 c/m)

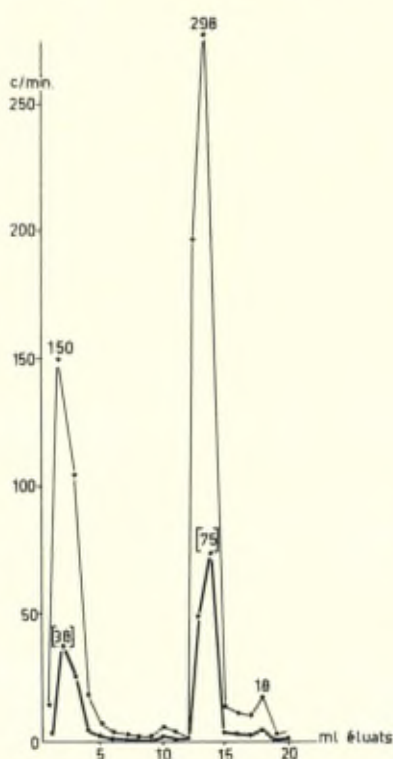


FIG. 26.

Elution du liquide de dialyse d'un extrait d'os d'embryons lathyriques (disséqués 28 h. après l'injection de ^{14}C -BAPN).

Colonne : 2 ml Dowex 50 H^+ $\times$ 8.

Fractions de 1 ml.

Echantillons comptés sur coupelles : 100 μl ; entre crochets [] : comptes ramenés à 25 μl .

de résines échangeuses d'ions de la façon suivante : après concentration et électrodialyse (cette dernière en vue de débarrasser les échantillons des sels accumulés par la concentration), les éluats sont analysés par électrophorèse sur papier sous une tension de 2.000 V en présence d'échantillons de substances témoins connues : BAPN, bêta-alanine et acide cyan-acétique (C.A.A.). Nous avons obtenu de la sorte une première identification des composants de nos pics d'élution ainsi que le montrent les figures 27 et 28.

La position des substances de référence est déterminée par une réaction colorée. La bande qui contient les éluats est alors découpée en rectangles dont la radioactivité est comptée dans un compteur à gaz. Les chiffres obtenus sont représentés par les hauteurs des colonnes hachurées replacées dans leur position d'origine sur la bande, ce qui permet de comparer la migration des composants de l'éluat à celle des substances de référence.

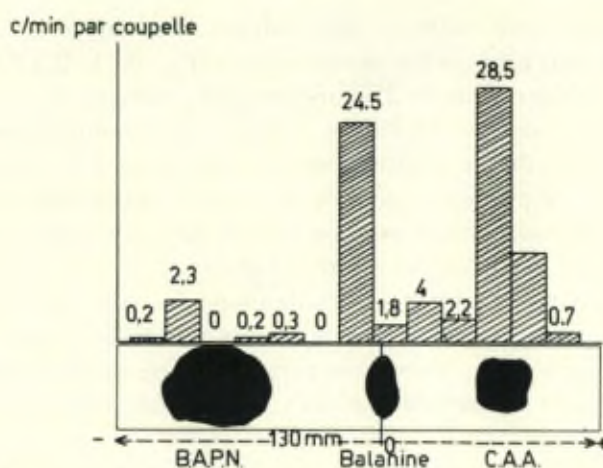


FIG. 27. Electrophorèse des fractions acide et neutre combinées (2 + 3 de la fig. 26).

Colonnes en grisé : activités en C/min.

En noir : localisation des marqueurs témoins.

O : Origine.

Conditions : 2.000 V, 10 min., 6 mA, 0,05 M acétate K, pH 5,3.

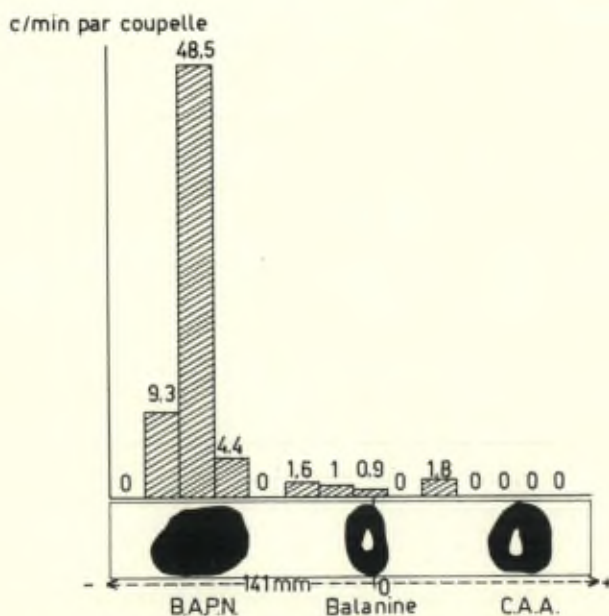


FIG. 28. Fraction basique (13 + 14 de la fig. 26).

Mêmes conditions que figure 27.

Appliquant cette méthode aux dialysats d'extraits d'os lathyrique (fig. 26), il nous est possible de reconnaître (fig. 28) le BAPN comme le constituant majeur du pic d'élution basique (fractions 13 + 14 combinées), la bêta-alanine et l'acide cyanacétique comme constituants majeurs (fig. 27) du pic « acide + neutre » (fractions 2 + 3 combinées). Les quantités de produit disponible ne nous ont pas permis d'identifier le petit pic basique qui fait suite au BAPN dans la courbe d'élution et qui se retrouve aussi dans les figures 21 et 23.

Dans le but d'obtenir une identification plus sûre, les échantillons soumis à une électrophorèse à haute tension sur feuille de papier ont été chromatographiés dans la direction perpendiculaire au champ électrique. Les résultats de 4 séparations dans deux solvants différents sont consignés dans le tableau 20.

Les taches identifiées par l'électrophorèse comme étant le BAPN et l'acide cyanacétique (fig. 28 et 27) se sont révélés homogènes à la chromatographie ; par contre, la fraction neutre, ne migrant pas à l'électrophorèse (fig. 27) s'est scindée à la chromatographie en deux constituants : une fraction neutre lente de même R_f (*) que la bêta-

TABLEAU 20

Rf des échantillons de la fraction électrophorétique neutre chromatographiés (en 2^e dimension) après électrophorèse (en 1^{re} dimension)

Solvants	Fraction neutre lente	Fraction neutre rapide	BAPN témoin	Bêta-alanine témoin
M.A.E.	0,21	0,85	0,44	0,21
M.P.E.	0,53	0,76	0,80	0,48
M.P.E.	0,47	0,64	0,73	—
M.P.E.	0,64	0,75	0,61	—

M.A.E. : méthyl-éthyl-cétone, acide propionique, eau (174 : 57 : 69).

M.P.E. : méthanol, pyridine, eau (80 : 20 : 4).

(*) R_f (facteur de rétention) : valeur caractérisant la vitesse de migration d'une substance en chromatographie (sur papier ou en couche mince). Elle est obtenue par le quotient de la distance séparant l'origine (point de dépôt) du point d'arrivée de la substance, sur la distance parcourue par le front de solvant depuis l'origine. Le R_f d'un composé est toujours inférieur ou égal à l'unité.

alanine dans les deux solvants étudiés et une fraction rapide qui ne présente que dans l'un des solvants un Rf semblable à celui du BAPN (tableau 20).

Nous avons recherché une confirmation de ces premiers résultats en préparant une plus grande quantité de matériel (surnageant d'homogénat précipité à l'ATCA) que nous avons soumis à une séparation chromato-électrophorétique (électrophorèse bidimensionnelle en rideau sur appareil Elphor préparatif) après électrodialyse et concentration. Cette étude confirme les résultats précédents : la fraction basique a été recueillie dans les tubes les plus proches de la cathode d'Elphor ; soumise à la chromatographie (tableau 21), elle avait le même Rf que le

TABLEAU 21

Rf de quatorze échantillons chromatographiés après isolement partiel par électrochromatographie

Solvants	Fraction neutre lente	Fraction neutre rapide	Fraction basique	Fraction acide	β -alanine	BAPN	CAA	HAN
M.A.E.	0,21	0,81	0,41	0,49	0,21	0,48	0,44	0,55
	0,28	0,81	0,46	0,52		0,48	0,47	
	0,28	0,76		0,56		0,49	0,49	
	0,26	0,76		0,50		0,44		
	0,26	0,74				0,47		
	0,26	0,72						
	0,27	0,69						
	0,27	0,75						
		0,72						
	0,53	0,75						
	0,56	0,78						
M.P.E.	0,46	0,72			0,40		0,57	
	0,44	0,79			0,46		0,58	
	0,54					0,58 0,54		

M.A.E. : méthyl-éthyl-cétone, acide propionique, eau (174 : 57 : 69) ;

M.P.E. : méthanol, pyridine, eau (80 : 20 : 4) ;

BAPN : bêta-amino-propionitrile ;

CAA : acide cyanacétique ;

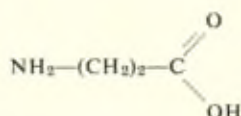
HAN : hydracrylonitrile.

BAPN, ce qui nous autorise à l'assimiler à cette substance ; la fraction recueillie dans les tubes proches de l'anode de l'appareil préparatif a été chromatographiée dans le même système ; son Rf était tout proche de celui de l'acide cyanacétique, ce qui nous porte à croire que cette substance est le principal constituant de la fraction acide. La fraction neutre, ne migrant pratiquement pas à l'électrophorèse, comprend deux constituants.

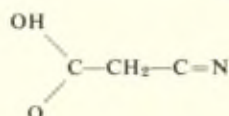
L'un d'eux, de Rf peu élevé et appelé fraction neutre lente partage les faibles propriétés de migration de la bêta-alanine à l'électrophorèse et en chromatographie (Rf = 0,21 à 0,28 dans le 1^{er} solvant, 0,44 à 0,54 dans le second) et peut lui être assimilé ; dans deux cas nous avons trouvé dans cette fraction neutre lente un constituant dont le Rf (0,53 et 0,56) était celui de l'hydracrylonitrile (0,55) ; malgré les tentatives plusieurs fois renouvelées, il ne nous a pas été possible de retrouver cette constatation. Le second constituant de la fraction électrophorétiquement neutre migre rapidement lors de la chromatographie dans divers milieux et n'a pu être identifié à aucun des métabolites connus du BAPN.

Les résultats de nos investigations à l'aide de BAPN marqué en C₁ par du carbone radioactif nous amènent donc à proposer l'existence dans les tissus d'embryons lathyriques de trois métabolites du BAPN marqués comme lui en C₁ :

la bêta-alanine

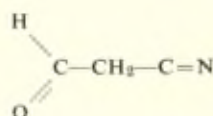


l'acide cyanacétique (C.A.A.)



et peut-être

l'hydracrylonitrile (H.A.N.)
ou aldéhyde de l'acide
cyanacétique



ainsi que d'un quatrième que nous n'avons pas réussi à identifier.

Considérées sous l'angle semi-quantitatif, nos données traduisent la dégradation progressive du BAPN en ses métabolites ainsi qu'il ressort de l'enrichissement progressif des homogénats des corps des embryons

en fractions acide et neutre (tableau 19 : fraction acide + neutre = 26,4 % à 24 h et 44,8 % à 48 h).

Ces observations nous amènent à examiner la possibilité d'un effet lathyrogène des métabolites du BAPN.

Les quantités de métabolites obtenues par fractionnement successif des homogénats se sont malheureusement avérées trop faibles pour nous permettre de les utiliser, après purification, dans des expériences d'injection *in vivo*. Nous nous sommes donc tournés vers des substances purifiées du commerce et avons testé leur effet lathyrogène éventuel sur des embryons au 14^e jour d'incubation. Dans un travail antérieur (LEVENE, GROSS et ORLOFF, 1960) nous avons montré que la bêta-alanine et l'acide cyanacétique étaient dépourvus d'effet lathyrogène. Il nous restait à étudier l'hydracrylonitrile.

Comme le montre le tableau 22, cette substance n'a pas provoqué l'apparition de collagène neutro-soluble en quantité supérieure à celle des témoins.

La première partie de nos expériences sur les transformations métaboliques du BAPN nous permet de conclure que le BAPN ne subit pas, par rapport à ses métabolites, de concentration sélective dans les

TABLEAU 22

Viscosité relative d'extraits salins d'os d'embryons
injectés au 14^e jour d'incubation et disséqués 24 h plus tard
(10 embryons par groupe)

Groupe	Viscosité relative
Lathyriques (20 mgr BAPN - fumarate)	10,1
Expérimentaux (11,4 mgr hydracrylonitrile) (*) . .	1,6 (**)
Contrôles (solution physiologique)	1,3 (**)

(*) 11,4 mgr d'hydracrylonitrile est la quantité équimoléculaire correspondant à 20 mgr de fumarate de BAPN.

(**) Ces valeurs se trouvent dans les limites de confiance définies au tableau 7 établissant les valeurs des viscosités d'extraits d'os normal.

tissus riches en collagène (fig. 26) et que les trois métabolites que nous avons identifiés ne sont pas lathyrogènes *in vivo*.

2. Incorporation du BAPN dans le collagène

Nous avons vu (fig. 26) que la distribution de la radioactivité non liée aux protéines, provenant de la courbe d'élution d'un dialysat d'extraits d'os est qualitativement la même que celle d'un homogénat d'embryon entier (fig. 21). Il restait à examiner le contenu en radioactivité des extraits eux-mêmes, ainsi que du collagène neutro-soluble qu'il est possible de préparer à partir de ceux-ci afin de déterminer si, à l'occasion d'un défaut métabolique propre au lathyrisme, le BAPN ou l'un de ses métabolites (tel la bêta-alanine par exemple) ne se trouvait pas incorporé soit dans la molécule de collagène elle-même au cours de sa synthèse, soit dans les réseaux cristallins en voie d'agrégation après la synthèse.

Les manipulations ont consisté à étudier d'une part la radioactivité d'extraits salins d'os lathyriques après en avoir éloigné le BAPN marqué par dialyse exhaustive et d'autre part à mesurer la radioactivité spécifique du collagène obtenu par purification de ces extraits. Bien que nous ayons démontré précédemment (tableau 13) que les incubations d'os lathyriques *in vitro* sont sans effet sur leur contenu en collagène neutrosoluble, il fallait s'assurer de ce point dans le cas de fragments d'os dialysés.

Les données du tableau 23 indiquent que la dialyse exhaustive, tant à froid qu'à 37°, de fragments d'os lathyriques en présence ou en l'absence de BAPN ne modifie pas le contenu en hydroxyproline de leurs extraits salins lorsqu'on les compare aux extraits incubés sans dialyse (« dialyse fantôme ») dans les mêmes conditions ($P > 0,05$ à 37°). Ces résultats confirment ceux que nous avons rapportés lors des expériences d'incubation *in vitro* (tabl. 12 et 13). La mesure de la radioactivité des extraits d'os dialysés permet de constater que l'activité spécifique par molécule de collagène est très inférieure à l'activité spécifique par molécule de BAPN injecté (tableau 24) ce qui permet d'exclure la possibilité d'une incorporation de la molécule marquée dans la molécule de collagène. Il persiste cependant dans les extraits d'os dialysés une certaine radioactivité de l'ordre d'une molécule radioactive par 14 à 30 molécules de collagène. Ce phénomène pourrait s'expliquer soit par l'incorporation du lathyrogène dans le réseau cristallin formé par les molécules de collagène soluble, soit plus simplement par une dialyse incomplète au sein d'un tissu aussi compact que l'os.

TABLEAU 23

**Contenu des extraits en hydroxyproline
après dialyse des os ayant servi à préparer ces extraits**

Les chiffres entre accolades correspondent à des parties aliquotes d'un même échantillon traitées parallèlement.

Milieu de dialyse	Contenu des extraits en OH-proline ($\mu\text{g OH pro/ml}$) Température et durée de la dialyse à 37° 40 h à 5°	
BAPN 1,7 mM dans NaCl 0,15 mM	360	360
	{440} {415}	
	(moyenne 405)	
NaCl 0,15 M	275	365
	{225} {370}	
	(moyenne 290)	
Dialyse fantôme	265	360
	{550} {607}	
	(moyenne 477)	

Si le lathyrogène s'était combiné au collagène à raison d'une molécule par 14 à 30 molécules de collagène et s'il en avait été extrait, fixé à la protéine, par le tampon salin neutre, nous aurions pu nous attendre à retrouver le même rapport des activités spécifiques collagène ^{14}C : BAPN au cours de cycles successifs de purification de la protéine ; or nous constatons que des purifications plus complètes et utilisant des dialyses plus nombreuses entre les précipitations aboutissent à diminuer encore ce rapport (tableau 25) ; des expériences ultérieures réalisées dans le même laboratoire ont permis d'atteindre un rapport de 1 : 180.

Les quantités absolues de produit radioactif qu'il a été possible de recueillir après ces diverses manipulations (purifications et dialyses exhaustives) étaient trop faibles pour en déterminer la nature mais il est

TABLEAU 24

Activités des extraits d'os lathyriques mesurées après dialyses exhaustives soit en présence de BAPN (1 et 2) soit en l'absence de celui-ci

Traitement de l'extrait	Activité spécifique du BAPN injecté C/min/ μ M BAPN	Radio-activité des extraits C/min/ml extraits	Contenu des extraits en hypro	Activité spécifique du collagène C/min/ μ M (*)	Rapport des activités spécifiques collagène et BAPN
1 : dial vs/BAPN	$5,1 \cdot 10^4$	20	440	$1,6 \cdot 10^3$	1 : 30
2 : idem	id.	20	415	$1,8 \cdot 10^3$	1 : 28
3 : dial. exh vs/NaCl	id.	20	225	$3,2 \cdot 10^3$	1 : 16
4 : idem	id.	25	370	$3,6 \cdot 10^3$	1 : 14

(*) Activité spécifique calculée sur la base d'un rapport de conversion de 120 γ hypro/mg de gélatine purifiée.

vraisemblable qu'il s'agit des mêmes molécules que celles obtenues par dialyse des extraits d'os lathyriques et caractérisés par chromatographie (fig. 26).

Il est donc permis d'affirmer que ni le BAPN, ni aucun des métabolites que nous avons isolés n'est incorporé dans la molécule de collagène soluble elle-même, ni fixé de manière irréversible sur une des molécules constituant le réseau cristallin de la protéine.

L'étude du métabolisme du BAPN chez l'embryon lathyrique ne donne pas d'explication sur le mécanisme d'apparition du collagène neutrosoluble. Nous avons voulu voir si ce phénomène pouvait être élucidé par l'étude du métabolisme de la molécule de collagène elle-même. Ce sera l'objet des recherches exposées dans le chapitre suivant.

TABLEAU 25

Activités spécifiques des solutions de BAPN injectées et du collagène extrait des os à l'aide de tampons de pH neutre après différents stades de purification

Traitement de l'extrait	Radioactivité injectée à l'embryon C/min/ μ M de BAPN	Radioactivité présente dans le collagène C/min/ μ M	Rapport des activités spécifiques collagène et BAPN
1. 1 gel + 1 lavage . .	1,3.10 ⁴	10.10 ⁵	1 : 0.13
2. 2 gels + 1 dialyse + 1 lyoph.	6,2.10 ⁴	12.10 ⁵	1 : 5
3. ppt hypot. + 1 dial. + 1 lyoph.	id.	1,5.10 ⁵	1 : 40
4. 2 gels + 1 dial. + lyoph.	id.	2,6.10 ⁵	1 : 24
5. Idem	id.	3,8.10 ⁵	1 : 16
6. ppt. Hypert. + 2 dial + lyophil. . .	id.	0,7 10 ⁵	1 : 94

B. ÉTUDE DU MÉTABOLISME DU COLLAGÈNE LATHYRIQUE

Introduction

La figure 29 représente schématiquement le métabolisme de la molécule de collagène normal.

Les études par radio-isotopes ont démontré que l'hydroxyproline du collagène ne provient pas de l'incorporation, dans la protéine, de l'acide aminé lui-même (UDENFRIEND, 1966), mais de l'hydroxylation d'une fraction de l'ensemble des molécules de proline incorporées en tant que telles dans les peptides.

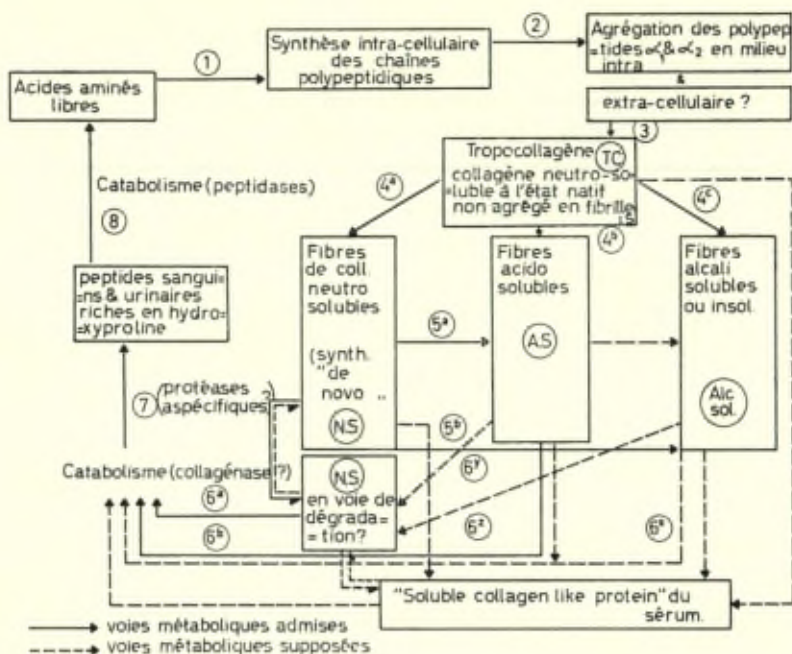


FIG. 29. Schéma du métabolisme du collagène.

NS : neutrosoluble ;
 AS : acidosoluble ;
 Alc. S : alcalinosoluble.

(D'après S. LINDSTEDT et D. J. PROCKOP, 1961, et Ch. M. LAPIÈRE, 1968.)

Il en résulte que l'injection de proline marquée à des animaux vivants sera suivie de l'apparition dans le collagène de proline et d'hydroxyproline marquées. Après hydrolyse des extraits et désamination des acides aminés par l'acide nitreux, il est possible (MIHYLL et JACKSON, 1965) de séparer les deux imino-acides par chromatographie sur couche mince.

TANZER et GROSS ont montré (1964) à la suite de SMITH et SHUSTER (1962) que l'injection de proline marquée à des embryons de poulets lathyriques est suivie d'une apparition de proline et d'hydroxyproline marquées dans le collagène neutrosoluble isolé à partir de leurs tissus ; une constatation analogue a été faite sur le collagène neutrosoluble d'animaux normaux marqués de la même façon. Dans les deux cas,

ces résultats indiquent une incorporation d'acides aminés dans un collagène de formation récente, qu'il soit normal ou lathyrique.

Les expériences que nous avons rapportées plus haut démontrent que le collagène neutrosoluble apparaît de façon précoce dans les tissus des embryons lathyriques ; son accumulation y est rapide et se produit sous le contrôle des processus métaboliques généraux régissant la croissance des embryons sans que le BAPN ou l'un de ses métabolites soient incorporés dans la molécule de collagène.

Il convient d'examiner comment le lathyrogène intervient pour modifier le déroulement du cycle métabolique de la protéine. Le collagène lathyrique est-il entièrement synthétisé *de novo* après l'injection de lathyrogène ou provient-il de la transformation d'un capital de collagène normal insoluble en molécules neutrosolubles ?

Dans le but de répondre à cette question, nous avons marqué le collagène à l'aide de proline radioactive, précurseur spécifique de la protéine en injectant cet acide aminé aux embryons. Après un délai de douze à vingt-quatre heures pour permettre la biosynthèse de la phase fonctionnelle du collagène, nous avons injecté du BAPN à tous les embryons. Chez la moitié d'entre eux, la radioactivité résiduelle du précurseur a été noyée, au moment de l'administration du BAPN, par l'injection simultanée d'une dose massive de proline non radioactive. Quatre heures plus tard, les embryons ont été disséqués et le collagène neutrosoluble extrait de leurs os. Les extraits ont été soumis à la dialyse pour les débarrasser de la proline radioactive. On dose alors l'hydroxyproline et on détermine son activité spécifique. Si celle-ci est élevée chez les embryons ayant reçu de la proline non radioactive, on peut affirmer que le lathyrisme accélère les mécanismes qui président à la transformation de collagène normal insoluble (préexistant donc à l'injection du BAPN), en collagène neutrosoluble (voies 6^y et 6^z de la fig. 29) ; une activité spécifique basse dans le collagène neutrosoluble apporterait au contraire la preuve de sa néogenèse.

Les résultats portés au tableau 26 proviennent d'expériences conduites sur trois lots d'incubation comprenant respectivement les groupes 1 et 2, 3 et 4 et le groupe 5. Le premier d'entre eux (n° 1) a servi de groupe pilote puisque la détermination de l'activité s'y est faite uniquement sur l'extrait brut après dialyse de celui-ci.

Dans les quatre groupes suivants, il apparaît qu'en l'absence d'injection de proline non radioactive aux embryons, le collagène extrait des os lathyriques a une activité spécifique plus élevée que celui que l'on obtient à partir d'embryons injectés simultanément de proline froide

TABLEAU 26

**Activité spécifique du collagène lathyrique
d'embryons de quinze jours soumis aux traitements suivants :**

Injection de proline³H (20 μ Ci/embryon 12 (*) et 24 (***) h avant le BAPN) aux embryons des groupes 2 à 5 et 20 + Ci de proline ¹⁴C 12 h avant BAPN aux embryons du groupe 1.

Injection de BAPN (30 mg/embryon).

Dissection et extraction 4 h après injection de BAPN.

Tous les embryons de la deuxième colonne sont injectés de proline froide (50 (***) et 100 (*) mg par embryon) en même temps qu'ils reçoivent le BAPN.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'embryons dont les os ont été prélevés en vue de l'extraction.

L'activité du collagène est exprimée en fonction des mesures d'activité spécifique faites sur l'hydroxyproline pour les groupes 2 à 4 et sur la proline pour groupe 5.

N°	Animaux lathyriques témoins (n'ayant pas reçu de proline non radioactive)	Animaux lathyriques d'expérience (ayant reçu de la proline non radioactive)
1	760 c/min/ml extrait (4*)	292 c/min/ml extrait (4*)
2	123, 8. 10 ³ c/min/ μ M collagène (4*)	18, 6. 10 ³ c/min/ μ M collagène (4*)
3	875, 6. 10 ³ c/min/ μ M collagène (5**)	16, 3. 10 ³ c/min/ μ M collagène (5**)
4	719, 3. 10 ³ c/min/ μ M collagène (5**)	647, 3. 10 ³ c/min/ μ M collagène (5**)
5	72. 10 ³ c/min/ μ M collagène (6**)	33. 10 ³ c/min/ μ M collagène (6**)

et de BAPN ; la différence entre ces animaux d'expérience et leurs contrôles est bien marquée, sauf pour le groupe 4 dans lequel la séparation chromatographique a été moins parfaite entre la proline et l'hydroxyproline.

Ces données, qui plaident en faveur de l'interprétation selon laquelle une partie importante du collagène lathyrique neutrosoluble serait de synthèse récente, postérieure à l'injection de BAPN, ne permettent pas cependant d'apporter d'arguments quantitatifs à l'appui de cette hypothèse.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Les études portant sur le métabolisme de BAPN et du collagène lathyrique nous permettent de conclure :

1. à l'existence de quatre métabolites du lathyrogène dont deux ont été identifiés avec certitude ;
2. à l'absence d'incorporation du BAPN ou d'un de ses métabolites dans la molécule de collagène ;
3. à la néogenèse d'une grande partie du collagène lathyrique à partir du pool d'acides aminés présents dans l'embryon au moment de l'injection du lathyrogène

DISCUSSION

1. SIGNIFICATION DE L'ÉTUDE DE LA FRAGILITÉ DES EMBRYONS

a. Embryons normaux

Notre technique de mesure de la fragilité peut s'appliquer à des embryons de poids très différents.

Ainsi que nous l'avons montré, il existe une relation linéaire entre le poids d'un embryon et le logarithme de la fragilité mécanique de son tissu de soutien.

Le collagène étant la protéine fibreuse la plus abondante dans les tissus de soutien, la question se pose immédiatement de savoir dans quelle mesure la résistance à l'étirement est une fonction de la quantité totale de collagène.

On sait par ailleurs (M. CHVAPIL, 1959 ; KIVIRIKKO, 1963) que la quantité totale de collagène présente dans les embryons de poulet augmente en fonction de leur poids (tableau 27).

TABLEAU 27
Contenu en hydroxyproline liée aux protéines
et poids des embryons de poulets en cours d'incubation
(d'après M. CHVAPIL, 1959)

Poids (poids frais en gr.)	Hydroxyproline (mg par embryon)
1,1	0,19
2,1	0,44
4,4	2,30
4,8	2,40
6,6	4,64
8,8	7,38
11,4	10
13,8	14
19,3	37

Il devient dès lors possible de rapporter la résistance à l'étirement des tissus d'embryons de poulets normaux à la quantité totale de collagène qu'ils contiennent (fig. 30), la majeure partie de cette protéine étant présente sous une forme insoluble dans les tampons neutres.

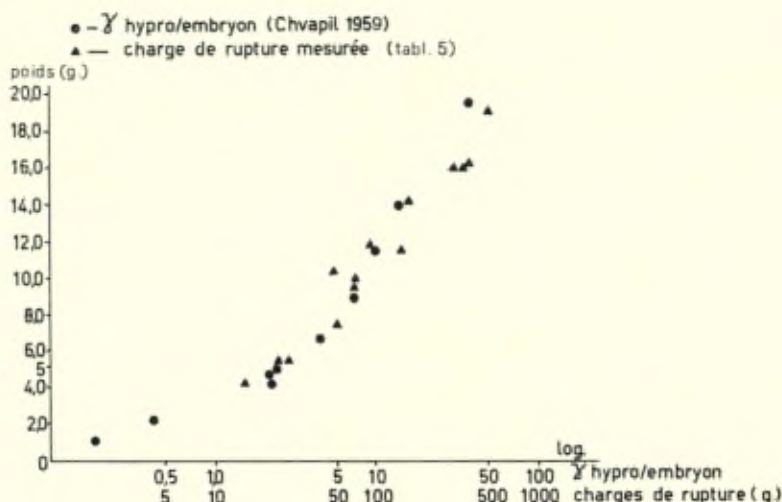


FIG. 30. Le logarithme du contenu total en hydroxyproline d'un embryon et le logarithme de la charge de rupture (qui est un paramètre inversement proportionnel à la fragilité des tissus) évoluent de façon identique en fonction du poids des embryons.

Ce rôle que nous accordons à la molécule de collagène dans le maintien de la résistance des tissus de soutien normaux aux sollicitations mécaniques ne doit pas faire perdre de vue la participation de la substance fondamentale à la structure de ces tissus ; en effet, D. JACKSON (1953), J. FESSLER (1960), et, plus récemment, R. MILCH (1966) ont attiré l'attention sur l'intervention de mucopolysaccharides dans l'élaboration de structure rigides extracellulaires.

b. Embryons lathyriques

La charge de rupture des tissus d'embryons lathyriques s'abaisse sous l'effet de l'intoxication et atteint celle d'embryons normaux plus jeunes (tableau 28). La fragilité augmentant chez les embryons lathy-

TABLEAU 28

Charges de rupture observées et calculées chez des embryons lathyriques et normaux : effet des doses de BAPN et des durées d'incubation

(Exprimées en unités de quatre heures : 6 q = 24 h ; 72 q = 12 jours d'incubation)

Temps d'incubation (en 1/6 ^e de jours)	Lathyriques				Témoins	
	Charges observées		Charges (*) calculées		Charges observées	Charges calculées
<i>BAPN :</i>	<i>1 mg</i>	<i>15 mg</i>	<i>1 mg</i>	<i>15 mg</i>		
72 q + 1	15,0	7,1	20,3	21,3	16,1	19,9
+ 5	4,9	3,6	23,9	27,5	25,2	26,2
+ 6,5	5,7	3,9	25,1	26,2	28,0	26,2
+ 8	16,9	—	53,5	—	58,3	40,6
+ 12	48,3	—	114,4	—	76,4	73,9
+ 16	106,8	—	117,1	—	167,9	132,4
+ 20	185,0	—	213,1	—	311,2	280,9
<i>BAPN :</i>	<i>20 mg</i>		<i>20 mg</i>			
84 q + 1	62,9		93,0		79,2	86,8
+ 7	44,2		194,3		164,1	189,9
<i>BAPN :</i>	<i>15 mg</i>		<i>15 mg</i>			
84 q + 1	56,6		70,0		74,1	65,8
+ 7	43,5		104,3		144,9	104,3
<i>BAPN :</i>	<i>5 mg</i>		<i>5 mg</i>			
84 q + 12	73,2		396,8		362,3	194,3 294,1
<i>BAPN :</i>	<i>20 mg</i>		<i>20 mg</i>			
90 q + 2,5	34,5		69,0		60,4	70,6
+ 6	19,5		111,8		113,3	117,1
+ 12	43,2		262,2		257,2	294,1

(*) Ces charges sont celles qui provoqueraient la rupture chez des embryons normaux de même poids que les embryons lathyriques pour lesquels ont été relevés les charges mentionnées dans la 2^e colonne (charges observées) ; il est donc normal que les valeurs des charges « calculées » du groupe lathyrique se rapprochent de celles des témoins.

riques en même temps que la quantité de collagène neutrosoluble, cette forme de la protéine ne joue aucun rôle dans la résistance mécanique des tissus.

On peut alors se demander si le collagène restant dans les tissus après leur extraction par les tampons neutres, peut être tenu pour responsable de la résistance mécanique de ces tissus. Dans cette optique, il serait intéressant de rechercher s'il existe entre la quantité de collagène insoluble dans les tampons neutres et la résistance à l'étirement des embryons lathyriques la même dépendance que celle que nous avons signalée pour les embryons normaux.

c. Conséquences de la fragilité mécanique des fibres collagènes

Outre les suites directes d'un abaissement de la résistance des tissus aux sollicitations mécaniques, telles les anévrismes, les déhiscences musculaires et hernies, les fractures et luxations spontanées, les hernies discales, il faut envisager les conséquences indirectes de la fragilité des fibres collagènes.

Citons notamment l'apparition d'ossifications ectopiques aux zones d'insertion des muscles. Il a été démontré (MURRAY, 1936) que des sollicitations mécaniques anormalement répétées ou élevées peuvent être une cause d'ossification des insertions tandineuses ; or, du fait de la fragilité des systèmes d'attaches des animaux lathyriques, les sollicitations mécaniques normales auxquelles sont soumis ces systèmes s'adressent à des structures dont la résistance a diminué ; ces structures sont donc soumises à des efforts supra-normaux. Les éléments cellulaires dont semble dépendre l'ossification chez l'animal normal (BASSET, 1966) réagiraient à cette excitation supra-normale par la formation de tissu osseux ; une telle interprétation a été confirmée par HAMRE et YEAGER (1958) qui ont montré chez les rats lathyriques que la section des muscles permettait d'éviter l'apparition des exostoses en leurs points d'insertion et favorisait par contre cette apparition aux tendons d'insertion des muscles compensateurs.

Les conséquences indirectes de la fragilité des fibres collagènes s'observent dès l'âge embryonnaire. Elles se manifestent par l'incurvation des os longs ou l'aspect tassé de tout l'embryon.

On voit ainsi que le lathyrisme fournit un moyen d'étudier la réaction d'une population cellulaire au milieu dans lequel elle baigne, et qu'elle a contribué elle-même à synthétiser.

Dans le cas présent, à une fragilité accrue du substrat, la cellule répond par une synthèse modifiée de mucopolysaccharides (VAN DEN HOFF, 1963, *op. cit.*) et l'apparition d'une minéralisation (YEAGER *et al.*, 1957). Ces deux réactions ainsi que la modification de la fragilité qui les a déclenchées se prêtent toutes trois à des mesures quantitatives.

La plupart des auteurs ayant étudié la période d'état et la phase tardive de l'ostéolathyrisme ont décrit des anomalies tinctorielles et des troubles du métabolisme des mucopolysaccharides (cf. introduction).

Bien que n'ayant pas abordé cet aspect du problème, nous avons vu qu'entre 96 et 120 h après injection du BAPN, les modifications des propriétés de solubilité du collagène ne rendent pas compte entièrement de l'évolution de la fragilité des tissus des embryons lathyriques entre 16 et 17 jours d'incubation : le retour à la normale de la quantité de collagène soluble des extraits d'os ne s'accompagne pas d'une restauration de la résistance des tissus.

Cette discordance pourrait suggérer que le lathyrisme atteint d'autres molécules que le collagène et par exemple les mucopolysaccharides.

Ceux-ci méritent d'être étudiés de manière plus approfondie afin de préciser la nature et l'importance des altérations dont ils sont l'objet et l'incidence de ces altérations éventuelles sur l'installation des lésions caractéristiques du lathyrisme.

En effet, ayant montré que la solubilité du collagène d'embryons lathyriques revient à la normale plus rapidement que ne le fait la résistance des tissus à l'étirement nous devons admettre que des facteurs autres que les propriétés physiques du collagène peuvent être responsables de la fragilité accrue des embryons, bien que dans une moindre mesure nous semble-t-il.

A la lumière de cette première partie de la discussion il ressort que notre méthode d'étude de la fragilité permet d'apprécier le rôle du collagène dans le maintien de la résistance mécanique des tissus à l'étirement ; elle permet également d'introduire la notion, basée sur un élément mesurable tiré de l'application de cette méthode aux embryons lathyriques, qu'il y a lieu de rechercher d'autres paramètres pour rendre compte des propriétés mécaniques des tissus de soutien.

2. EFFETS DU LATHYROGÈNE IN VITRO

a. Incubation d'os isolés

Au moment où nous faisons nos expériences sur les explants d'os, MARTIN (1963) en effectuait de semblables en présence de proline radioactive.

Cet auteur, en utilisant les traceurs isotopiques, a pu déceler la production *de novo* de collagène neutro-soluble lathyrique dans des os explantés et cultivés *in vitro*.

Le phénomène était quantitativement peu important, ce qui s'explique par le métabolisme fortement réduit des os *in vitro* ainsi qu'en témoignent nos propres expériences sur la croissance d'os explantés.

On comprend aisément, grâce aux résultats publiés par MARTIN, que les méthodes conventionnelles, non isotopiques, ne nous aient pas permis de mettre en évidence l'apparition de collagène neutro-soluble dans les os lathyriques *in vitro*.

Nos données confirment que l'apparition dans le tissu osseux de collagène lathyrique est indissociable de l'activité métabolique de l'os lathyrique.

b. Etude sur le collagène in vitro

Depuis la communication préliminaire de l'auteur sur l'effet des lathyrogènes sur le collagène purifié incubé « *in vitro* » (1960) ce problème a été étudié dans divers laboratoires. Certaines hypothèses ont été avancées pour rendre compte de l'action de ces substances : l'une d'elles fait état de l'inhibition de liaisons intermoléculaires par blocage de groupements carboxyles ; une deuxième, développée par BENSUSAN (1966) fait intervenir la formation de liaisons N-glucidiques aboutissant à l'établissement de liaisons intermoléculaires par l'intermédiaire de bases de Schiff, bases pour lesquelles les lathyrogènes entreraient en compétition avec la molécule de collagène ; une troisième hypothèse est basée sur l'interaction des groupements aldéhydes avec les lathyrogènes (ROJKIND, 1966).

¹⁰ TANZER et GROSS (1966) ont étudié en détail en milieu acide, l'effet d'un lathyrogène marqué au ³⁵S, la thiosemicarbazide (TSC) sur du collagène purifié et ils concluent à l'existence d'une liaison covalente

fixant deux molécules de TSC par molécule de protéine ; les deux polypeptides α_1 de la molécule de collagène fixeraient ensemble une molécule de TSC ; la chaîne polypeptidique α_2 en fixerait à elle seule une seconde ; il est possible que cette réaction bloque des groupements carboniles qui, dans des conditions normales, pourraient établir les liaisons intermoléculaires au cours de l'accolement des molécules de collagène en fibrilles ; les auteurs proposent d'expliquer l'apparition de collagène neutro-soluble par une inhibition de la formation de ces liaisons intermoléculaires, cependant que les liaisons intramoléculaires (entre les différentes chaînes α_1 et α_2) resteraient à l'abri de cet effet inhibiteur.

2^o BENSUSAN (1966) a proposé l'existence d'un type différent de liaisons inter-moléculaires, compatibles elles aussi avec les observations expérimentales. Cet auteur a démontré (schéma 1) :

1. Que les hexoses peuvent former des liaisons N-glucidiques avec les groupements ϵ -aminés de la lysine et/ou de l'hydroxylysine du collagène ;

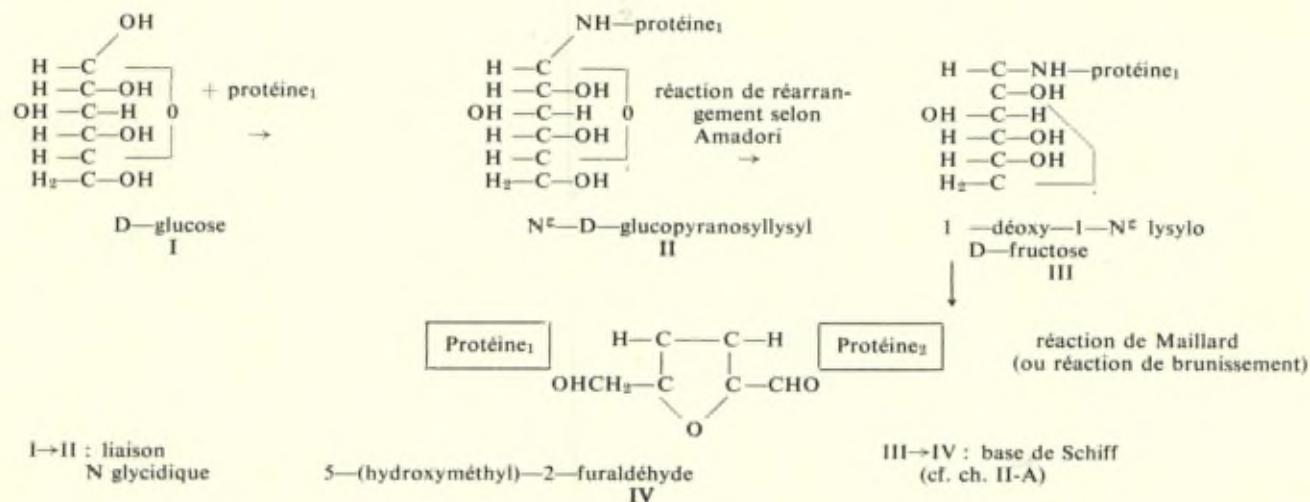
2. Que les produits ainsi obtenus peuvent subir les réactions de brunissement à l'issue desquelles se trouverait synthétisée la base de Schiff correspondant à l'hydroxyméthylfurfural. En l'absence de lathyrogène, la base de Schiff serait formée par réaction avec le résidu histidine d'une molécule de collagène voisine pour former une liaison inter-moléculaire. Par contre, en présence d'un lathyrogène, ce dernier se substituerait à la seconde molécule de protéine et formerait lui-même une base de Schiff avec l'hydroxyméthylfurfural ; il empêcherait de cette façon l'établissement de la liaison postulée avec une deuxième molécule de protéine.



(P : protéine ; L : Lathyrogène ; F : furfural).

Cette réaction a été réalisée en éprouvette sur un modèle où $P - NH_2$ était représenté par la butylamine ; la quantité de butylamine libérée au cours de la réaction par un lathyrogène, rapportée à la quantité libérée par le BAPN est proportionnelle au rapport :

$$\frac{\text{Activité lathyrogène in vivo du produit étudié}}{\text{activité lathyrogène in vivo du BAPN}}$$



SCHEMA 1. Chaîne des réactions possibles amenant à la production d'hydroxyméthyl furfural au départ de glucose et d'une molécule de protéine (collagène) (cf. texte).

(D'après BEN SUSAN, 1966.)

Une telle interprétation de la réaction *in vitro* entre BAPN et collagène postulerait qu'une portion de la molécule de collagène servirait d'intermédiaire à la formation de base de Schiff puisque l'expérience *in vitro* se passe en absence d'hexose ; nous avons vu en effet que la molécule de collagène contient 12 hexoses et un ou deux groupements aldéhyde. Dans les os *in situ* des hexoses libres pourraient se trouver disponible pour former une base de Schiff avec la lathyrogène et empêcher celui-ci de se fixer sur la molécule de collagène. Cette façon de voir permettrait de comprendre pourquoi le BAPN est dépourvu d'action sur le collagène des tissus morts alors qu'il rend neutro-soluble le collagène purifié.

Une troisième hypothèse a été envisagée par GALLOP (1965) : cet auteur postule que les groupements aldéhydes de la molécule de collagène pourraient contracter des liaisons intra et intermoléculaires. L'inhibition de ces dernières par les lathyrogènes rendrait compte de l'apparition du collagène neutro-soluble chez les animaux intoxiqués : ROJKIND (1966) a observé que le collagène extrait d'os et du derme d'embryons lathyriques contient moins d'aldéhydes que la protéine extraite des tissus d'animaux normaux et il a montré que le défaut portait de façon spécifique sur la chaîne α_1 , celle-ci, chez les animaux lathyriques ne comprend que la moitié des résidus aldéhydes présents dans le peptide α_1 provenant de collagène normal.

Une telle hypothèse rend compte d'observations antérieures de C. LEVENE (1961) ; celui-ci a montré que l'effet de certains agents lathyrogènes *in vivo* en particulier des uréides et des hydrazides, était inhibé par le pyridoxal à condition que le groupement aldéhyde de ce dernier fût libre de se combiner au lathyrogène et de former avec lui une base de Schiff.

Nos propres travaux ne permettent pas de trancher entre ces différentes hypothèses ; nous verrons néanmoins dans un paragraphe ultérieur comment des réactions *in vitro* du type de celles qui viennent d'être évoquées et apparemment indépendantes du métabolisme des animaux d'expérience, pourraient malgré tout rendre compte des phénomènes observés *in vivo*.

3. ÉTUDES IN VIVO

a. Sur le BAPN

Nous avons démontré la possibilité de séparer le BAPN du collagène par des dialyses et des purifications successives de la protéine extraite des os lathyriques, jusqu'à obtenir un rapport molaire BAPN/Collagène approchant de 1 : 100 ; cette observation a été confirmée récemment par TANZER et GROSS (1966) avec un autre lathyrogène, la thiosemicarbazide par laquelle le rapport TSC/Collagène s'abaisse à 1 : 50, après diverses purifications.

Un rapport molaire aussi faible rend peu probable la possibilité d'une combinaison chimique entre le lathyrogène et la molécule de collagène ; il est vraisemblable qu'il s'agit d'un simple phénomène d'adsorption, d'ailleurs non spécifique ; en effet, le TSC se fixe sur l'hémoglobine *in vitro* dans les mêmes proportions.

On peut donc écarter l'hypothèse d'une incorporation de l'agent lathyrogène à la molécule de collagène pendant sa synthèse *in vivo*.

b. Sur les métabolites de BAPN

Nous avons pu isoler quatre métabolites du BAPN ; deux d'entre eux ont été identifiés à la bêta-alanine et à l'acide cyanacétique ; un troisième pourrait être l'hydracrylonitrile, le quatrième n'a pu être identifié.

A la lumière des hypothèses proposées par BENSUSAN (1966) nous pourrions nous demander si le pic radioactif non identifié ne serait pas un métabolite de la base de Schiff du lathyrogène.

Mais il n'est pas possible de confirmer cette interprétation aussi longtemps qu'on ne disposera pas de quantités plus importantes des métabolites du BAPN aux fins de déterminations analytiques.

c. Sur le collagène

Nos expériences effectuées à l'aide d'acides aminés précurseurs du collagène marqués au ^{14}C ou ^3H ont montré la part prépondérante de la néogenèse dans l'apparition du collagène neutro-soluble lathyrique ; elles aboutissent aux mêmes conclusions que les études de SMITH *et coll.* (1962), TANZER et GROSS (1964), ORLOFF (1966).

TANZER et GROSS signalaient cependant que leurs résultats ne permettent pas d'exclure une éventualité différente, à savoir la transformation de collagène normal déjà formé en collagène lathyrique. Dans des expériences de double marquage à 24 h d'intervalle, ils avaient constaté que l'incorporation d'acides aminés (glycine et proline) dans le collagène neutro-soluble s'effectuait par vagues successives après le second marquage, tant dans le collagène normal que dans le collagène lathyrique ; ce dernier se différenciait du précédent par le fait que les pics d'incorporation des deux acides aminés n'y étaient pas synchrones.

Ces fluctuations asynchrones pourraient s'expliquer par une incorporation dans le collagène lathyrique d'acides aminés marqués et d'acides aminés non marqués. Ceux-ci proviendraient de la dégradation du collagène normal synthétisé avant toute injection de précurseurs radioactifs ; ceux-là seraient libérés par la dégradation du collagène synthétisé entre les deux injections de précurseurs.

Cette interprétation cadrerait avec l'hypothèse de la néogenèse exclusive du collagène lathyrique. Mais on pourrait expliquer aussi l'asynchronisme des pics d'activité spécifique des deux acides aminés par la coïncidence de la néogenèse de collagène lathyrique et de vagues successives de transformation du collagène normal non marqué en collagène lathyrique neutro-soluble.

En l'absence de données sur le fonds commun d'acides aminés précurseurs libres, il n'est pas possible de choisir entre les deux interprétation.

TANZER et GROSS (1964) ont tenté de résoudre le problème en injectant de la puromycine aux embryons lathyriques ; ils ont constaté que cette substance arrêta la production de collagène neutro-soluble, ce qui apporte un argument supplémentaire à l'hypothèse de la néogenèse, sans exclure toutefois l'intervention d'un autre mécanisme : nous ne savons pas, en effet, si une dégradation partielle du collagène normal insoluble en collagène lathyrique, ne nécessite pas l'apport d'un contingent d'enzymes dont la puromycine peut fort bien avoir bloqué la synthèse au même titre qu'elle bloque celle du collagène neutro-soluble.

Il faut enfin revenir à l'hypothèse d'un enrichissement du fonds commun d'acides aminés en précurseurs non radioactifs par dégradation accrue du collagène normal non marqué, synthétisé et précipité avant toute injection ; cette hypothèse paraît s'inscrire dans la logique des faits : on sait que les sollicitations mécaniques stimulent (chez l'animal normal) la synthèse du collagène neutro-soluble (Grillo) : or

la fragilité des tissus de soutien lathyriques est une source de stimulations mécaniques accrues au niveau des éléments cellulaires de ces tissus.

Si les mécanismes d'homéostasie responsables de la résorption normale de la matrice protéique osseuse sont soumis aux à-coups d'une synthèse de collagène exagérée et désordonnée, on concevrait aisément que la dégradation du collagène normal se fit par vagues plus irrégulières chez l'embryon lathyrique que chez l'embryon normal, ce qui pourrait rendre compte des particularités signalées par TANZER et GROSS dans leurs expériences à double marquage et fournirait un argument supplémentaire à l'hypothèse de néogenèse du collagène lathyrique.

Les travaux de WEISSMAN *et al.* (1961) ont attiré l'attention sur la possibilité de l'intervention d'une réaction enzymatique pour rendre compte de l'apparition de collagène neutro soluble dans les tissus ; l'existence d'une telle réaction a été confirmée par PAGE *et al.* (1966) ; K. PIEZ (1968) a étudié les diverses étapes de la réaction de désamination oxydative que subissent les résidus α -aminés de la lysine et qui amènent à la formation de liaisons intermoléculaires par l'intermédiaire des groupements semi-aldéhyde issus de l'oxydation. R. B. RUCKER *et al.* (1969a) sont parvenus à isoler cette enzyme à partir d'os d'embryons de poulets, à montrer (1969b) qu'elle requiert la présence de cuivre et de phosphate de pyridoxal et qu'elle est inhibée de manière compétitive par le bêta amino propionitrile.

Bien que ces dernières constatations ne puissent rendre compte du mécanisme observé *in vitro*, elles confirment celles de nos observations qui établissent qu'il est nécessaire que les embryons soient en vie et en croissance active afin que se développent les anomalies caractéristiques de l'ostéolathyrisme.

ANNEXE

LES variables que nous avons utilisées sont les suivantes :

- a) variable fixée : le temps d'incubation (compris entre 12 et 19 jours) ;
- b) variables aléatoires :
 - 1. le poids des embryons ;
 - 2. la charge de rupture (pour une charge établie à débit constant) ;
 - 3. le temps de rupture ;
 - 4. la fragilité.

La distribution des données individuelles a été étudiée dans tous les groupes d'animaux tant normaux que lathyriques, de même que la distribution des moyennes des différents groupes.

Dans chaque groupe étudié, les différentes variables ont une distribution gaussienne ainsi qu'il ressort des test de Rankit. Il en est de même des moyennes en ce qui concerne les poids d'embryons normaux et lathyriques.

Par contre, les moyennes des charges et des temps de rupture ont une distribution log-gaussienne.

Les relations unissant les variables aléatoires à la variable fixe sont les suivantes :

- 1. Le poids (P, en grammes) en fonction de la durée d'incubation (j en jours)

$$P = -28 + 2,65j \text{ pour } 12 < j < 19 \text{ jours (fig. 31).}$$

- 2. La charge de rupture des embryons (Ch, en grammes) en fonction de la durée d'incubation :

$$\text{Ch} = 0,54 (10^{0,25 j})$$

Les variables aléatoires sont unies entre elles par les relations suivantes :

3. La charge de rupture en fonction du poids des embryons (fig. 32)

$$\text{Ch} = 7,56 (10^{0,10 \text{ p}}) ;$$

le coefficient de corrélation entre les deux droites de régression exprimant le logarithme de la charge en fonction du poids et

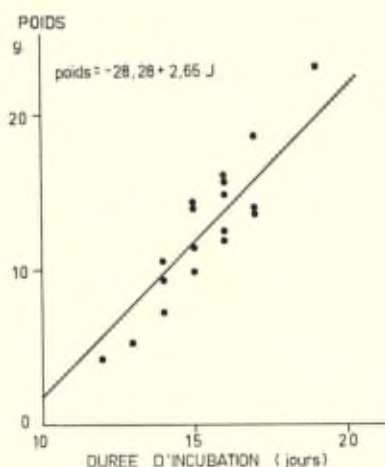


FIG. 31.

Evolution du poids des embryons normaux (en g) en fonction de la durée d'incubation (en jours).

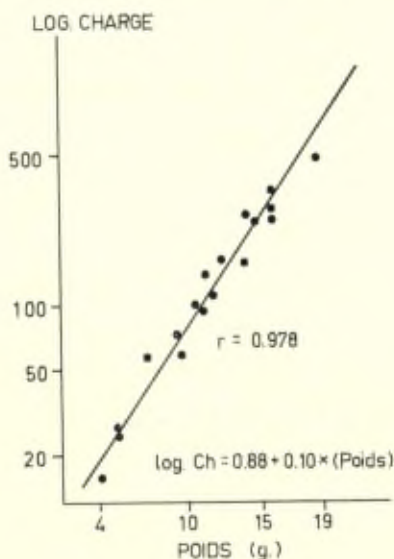


FIG. 32.

Logarithme des charges de rupture en fonction du poids des embryons normaux (tous deux en grammes).

ce dernier en fonction du logarithme de la charge est $r(\log \text{ Ch, poids}) = 0,978$.

4. Le temps de rupture (en secondes) en fonction du poids des embryons :

$$T = 13,19 (10^{0,06 P}) \quad r(\log T, \text{ poids}) = 0,777$$

Il ressort de la comparaison des données 3 et 4 que la charge de rupture est un paramètre plus fidèle que le temps de rupture, ce dernier étant probablement plus dépendant du débit servant à établir la charge.

Cette indépendance des charges vis-à-vis du débit apparaît d'autant mieux lorsqu'on examine les coordonnées à l'origine et les pentes des droites de régression unissant les logarithmes des temps et charges de rupture aux poids des embryons et cela pour les différents groupes : pour 13 groupes d'embryons dont les charges de rupture ont été établies sous un débit de 2,13 ml/sec en moyenne on a :

$$\log \text{ Ch} = 0,812 + 0,106 P \quad (r = 0,9151) \quad (5)$$

et pour 7 groupes d'embryons dont les charges ont été établies sous un débit très différent de 2,13 ml/sec (allant de 0,25 à 1,55) on a :

$$\log \text{ Ch} = 0,907 + 0,098 P \quad (r = 0,985) \quad (6)$$

Par contre les droites de régression des logarithmes des temps de rupture en fonction des poids pour les mêmes groupes d'embryons s'établissent de la façon suivante :

$$\log T = 0,433 + 0,111 P \quad (r = 0,972) \quad (\text{débits} = 2,13 \text{ ml/sec}) \quad (7)$$

$$\log T = 1,354 + 0,061 P \quad (r = 0,926) \quad (\text{débits} \neq 2,13 \text{ ml/sec}) \quad (8)$$

Ce qui montre bien que les pentes et les ordonnées à l'origine des droites (5) et (6) se rapportant aux charges de rupture sont beaucoup plus proches l'une de l'autre que dans le cas des temps de rupture (7) et (8).

La relation unissant les charges aux temps de rupture ressort de la solutions du système de deux équations 3 et 4 :

$$\log T = 0,59 + 0,60 \log \text{ Ch} \quad (9)$$

Le calcul de la droite de régression entre ces variables peut être obtenu à partir des données de départ (tableau 5) :

$$\log T = 0,60 + 0,61 \log Ch \quad r(\log T, \log Ch) = 0,775 \quad (10)$$

L'ensemble de ces données permet de choisir la charge de rupture d'un embryon comme le paramètre le mieux approprié à la mesure de la résistance mécanique des tissus à l'arrachement, c'est-à-dire la solidité de ces tissus au sens mécanique du terme.

Il est possible d'en déduire le paramètre inverse, la fragilité (F). On peut montrer alors qu'au départ de

$$\log Ch = \log 7,56 + 0,1 P \quad (\text{tiré de 3})$$

et

$$\log \frac{1}{Ch} = \log F$$

on obtient

$$\log F = 1,12 - 0,1 P$$

ou

$$F = 0,05 (10^{-0,1 P}) \quad (11)$$

La relation (11) exprime la fragilité des tissus d'embryons en fonction de leur poids ; elle est valable pour l'espèce considérée (White Leghorn) et la fourchette d'âge étudiée (entre 12 et 19 jours d'incubation).

L'application de ces données (3) aux embryons lathyriques permet de comparer l'évolution dans le temps des charges de rupture calculées en fonction du poids et des charges observées en fonction de la dose de lathyrogène et la durée d'incubation (tableau 28). Le caractère réversible des phénomènes observés est frappant à 12 jours et nettement ébauché à 15 jours d'incubation (72 et 90 μ g respectivement).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1. — Le calcul permet de déterminer la fragilité de l'embryon de poulet d'une espèce donnée de manière relativement précise en fonction de son poids dans la fourchette d'âge comprise entre 12 et 19 jours d'incubation.

2. — Le BAPN détermine chez l'embryon de poulet une intoxication qui se traduit par une fragilité mécanique des animaux et par l'apparition d'une quantité exagérée de collagène neutrosoluble anormal. Celui-ci est mis en évidence par la viscosité des extraits salins neutres des os et par leur contenu en hydroxyproline. Ces deux paramètres sont liés par une relation linéaire étroite. La fragilité des tissus lathyriques et le contenu des extraits d'os en collagène neutrosoluble suivent une évolution parallèle mais non identique au cours du temps.

3. — L'intensité de l'intoxication est pour une même température d'incubation fonction linéaire du logarithme de la dose du lathyrogène administré ; pour une même dose elle est fonction du taux de croissance des embryons, partant de leur activité métabolique (celle-ci est conditionnée par la température d'incubation).

4. — Le collagène normal purifié, incubé en présence de BAPN en milieu acide peut devenir soluble dans des tampons d'extraction de pH neutre ; cependant les concentrations de BAPN nécessaires pour obtenir cette solubilisation *in vitro* sont supérieures à celles qu'on observe chez l'animal vivant injecté de BAPN. D'autre part, le collagène tissulaire des animaux morts, incubé en présence de BAPN *in situ* ou *in vitro*, ne se transforme pas en collagène neutrosoluble lathyrique ; ces expériences montrent que la formation de collagène neutrosoluble lathyrique *in situ* requiert l'intervention d'une activité métabolique.

5. — La formation de collagène lathyrique ne semble pas due à l'incorporation de BAPN ou d'un de ses métabolites dans la molécule de collagène.

6. — Les expériences pratiquées à l'aide d'acides aminés radioactifs montrent que le collagène lathyrique se forme par un mécanisme de néogenèse à partir des acides aminés précurseurs. Il n'est toutefois pas exclu qu'une partie du collagène lathyrique trouve son origine dans une transformation du collagène normal sous l'effet direct ou indirect de l'introduction de BAPN dans l'organisme.

BIBLIOGRAPHIE

- V.P. AMATO and R. BOMBELLI. Early Skeletal and Vascular Changes in Rats fed on Sweet Pea (*Lathyrus Odoratus*) Seeds. *J. Bone and Joint Surg.*, **41B**, 600, 1959.
- A. ASCHKENASY, M. AUFFRET et M. PIETTE. Phosphatases alcalines de l'os et de la moëlle osseuse dans l'ostéolathyrisme du rat. *Comptes rendus des séances de la Soc. de Biol.*, **153**, 562, 1959.
- B.D. BARNETT, H.R. BIRD, J.J. LALICH and F.M. STRONG. Toxicity of beta-aminopropionitrile for turkey poults. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **94**, 67, 1957.
- H.B. BENSUSAN. A novel hypothesis for the mechanism of cross linking in collagen. In : *Structure and Function of Connective and Skeletal Tissues*. G. Tristram, R. Harkness & G.F. Jackson ed. Butterworths London 1966, page 42.
- H.B. BENSUSAN, S.D. MCKNIGHT and M.S.R. NAIDU. The demonstration of a possible common mechanism of lathyrogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **23**, 128, 1966.
- C.A.L. BASSETT and T.P. RUEDI. Transformation of fibrous tissue to bone *in vivo*. *Nature*, **209**, 988, 1966.
- L.F. BELANGER. Observations on the manifestations of osteolathyrism in the chick. *Journ. of Bone & Joint Surgery*, **41B**, 3, 581, 1959.
- I. BERGMAN and R. LONLEY. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, **35**, 1961, 1963.
- L. BOLOGNANI and A.V. LONERI. Decrease of sialic acid in epiphyseal plates of A. A.N. treated Rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **108**, 111, 1961.
- A.B. BORLE, M.J. KARNOVSKY and G. NICHOLS Jr. Changes in inorganic composition of tissues in experimental osteolathyrism. *Amer. Journ. Physiol.*, **197**, 1224, 1959.
- P. BORNSTEIN and K.A. PIEZ. A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra and intermolecular cross linking. *J. Clin. Invest.*, **43**, 1813, 1964.
- P. BORNSTEIN, G.R. MARTIN and K.A. PIEZ. Intermolecular cross linking of collagen and the indentification of a new beta-component. *Science*, **144**, 1220, 1964.
- P. BORNSTEIN and K.A. PIEZ. Collagen : structural studies based on the cleavage of methionyl bonds. *Science*, **148**, 1353, 1965.

- O.O. BLUMENFELD and P.M. GALLOP. The participation of aspartyl residues in the hydroxylamine or hydrazine sensitive bonds of collagen. *Biochemistry*, **1**, 947, 1962.
- S. BUMP, Z. DEYE and J. ROSMUS. Studies on the structure of collagen. IV. C-terminal sequence from the pronase treated collagen. *Experientia*, **23**, 518, 1967.
- R.E. BURGE. X Ray aspects of the structure of collagen with particular emphasis on the relationship in structure between this and other fibrous proteins. In : *Structure and function of Connective and Skeletal Tissues*. G. Tristram, R. Harkness and S.F. Jackson ed. Butterworths London 1966, page 2.
- E.F. BUZZARD and J.G. GREENFIELD. *Pathology of the Nervous System*. Constable, London, 1921.
- W.W. CARLTON. Beta-aminopropionitrile toxicity in the white Pekin duck. *Avian Diseases*, **9**, 423, 1965.
- A.A. CASTELLANI and CASTELLANI BISI. Decrease in hexosamine content of epiphyseal plate in experimental lathyrism. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **98**, 318, 1958.
- C. J. CHANG, E. WITSCHI and I.V. PONSETI. Teratogenic effects of Lathyrus Odoratus seeds on development and regeneration of vertebrate limbs. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **90**, 45, 1955.
- CHEVALIER. Le Lathyrisme. *Ann. d'Hyg.*, **26**, 126, 1841.
- M. CHVAPIL. Changes in free and bound hydroxyproline during the development of normal and cortisone treated embryos. *Physiol. Bohemoslov.*, **8**, 196, 1959.
- J. J. CLEMMONS and D.M. ANGEVINE. The occurrence of multiple fractures in suckling rats injected with beta-aminopropionitrile. *Am. J. Pathol.*, **1**, 175, 1957.
- W. DASLER. a) Observations on odoratism in the rat (sweet pea lathyrism). *J. Nutrition*, **53**, 105, 1954.
- W. DASLER. b) Indications of a disturbance in collagen metabolism in experimental lathyrism. *Fed. Proc.*, **13**, 1954. Comm. No. 1700.
- W. DASLER. c) Isolation of toxic crystals from sweet pea (lathyrus odoratus). *Science*, **120**, 307, 1954.
- W. DASLER. d) Production of experimental lathyrism in the rat by two beta substituted ethylamines. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **88**, 196, 1955.
- J. DECKER, C.I. LEVENE and J. GROSS. Effect of beta aminopropionitrile (Lathyrus Factor) on free hydroxyproline, proline and glycine in chick embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **101**, 472, 1959.
- J. E. EASTOE. Composition of young collagen in relation to synthesis. In : *Structure and function of Connective and Skeletal Tissues*. Butterworths. London 1966, page 330.

- B. ENGFELDT, B. TEGNER and E. BERGQUIST. Early changes in the epiphyseal growth zone in experimental osteolathyrism. *Acta Patbol. and Microbiol. Scand.*, **49**, 93, 1960.
- J.M. FESSLER. A structural function of mucopolysaccharide in connective tissue. *Biochem. J.*, **76**, 124, 1960.
- I.N. FILIMONOFF. Zur pathologisch-anatomischen Charakteristik des lathyrismus. *Z. Neur.*, **105**, 76, 1926.
- C. FRANSBLAU, S. SEIFTER and P.M. GALLOP. The presence in collagen of β -glutamyl peptide linkages. *Biopolymers*, **1**, 79, 1963.
- P.M. GALLOP, O.O. BLUMENFELD, M. ROJKIND and M.A. PAZ. Subunits and their mode of attachment in tropocollagen. In: *Structure and Function of Connective and Skeletal Tissue*. Butterworths London 1966.
- P.M. GALLOP, S. SEIFTER and E. MEILMAN. Occurrence of « ester-like » linkages in collagen. *Nature (London)*, **183**, 1659, 1959.
- B.J. GEIGER, H. STEENBOCK and H.T. PARSONS. Lathyrism in the rat. *J. Nutrition* **6**, 427, 1933.
- E.P. GILLETTE. *Anatomie et physiologie du tissu conjonctif ou lamineux*. Thèse, Paris, 1872.
- T. GILLMAN and M. HATHORN. Post natal vascular growth and remodeling in the pathogenesis of arterial lesions. *Schw. Ztschr. f. Allgem. Patb. und Bakteriol.*, **22**, 62, 1959.
- M.J. GLIMCHER. Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. *Reviews of Modern Physics*, **31**, 359, 1959.
- M.J. GLIMCHER, C.J. FRANÇOIS, L. RICHARDS and S.M. KRANE. The presence of organic phosphorus in collagens and gelatins. *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 585, 1964.
- K. GOERTTLER and F. HARTMANN. Histopathologische Befunde am Hühnchenkeim nach Applikation von Beta-Aminopropionitril (BAPN; Lathyrusfaktor). *Klinische Wochenschrift*, **39**, 1077, 1961.
- W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. SCHLEYER. Zür Aminosäuresequenz des Kollagens II. *Hoppe Seyler's Ztschr. f. Phys. Chem.*, **322**, 71, 1960.
- H. GRILLO. Communication personnelle.
- J. GROSS. Studies on the formation of collagen I. Properties and fractionation of neutral salt extracts of normal guinea-pig connective tissue. *J. Exp. Med.* **107**, 247, 1958.
- J. GROSS. Studies on the formation of collagen. II. The Influence of growth rate on neutral salt extracts of guinea-pig dermis. *J. Exp. Med.*, **107**, 265, 1958.

- J. GROSS. Studies on Collagen formation. III. Time dependant solubility changes of collagen « in vitro ». *J. Exp. Med.*, **108**, 215, 1958.
- J. GROSS. Collagen. *Scientific American*, **204**, V, 120, 1961.
- J. GROSS. The Behavior of collagen units as a model in morphogenesis. *The Journ. Biophys. and Biochem. Cytol. Suppl.* 2, **4**, 261, 1956.
- J. GROSS. An Intermolecular defect of collagen in experimental lathyrism. *Biochem. Biophys. Acta*, **74**, 250, 1963.
- J. GROSS. An Intermolecular defect of collagen in experimental lathyrism. *Biochem. Biophys. Acta*, **74**, 314, 1963.
- J. GROSS, J.H. HIGHBERGER and F.O. SCHMITT. Extraction of collagen from Connective tissue by neutral salt solutions. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **41**, 1, 1955.
- J. GROSS and D. KIRK. The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions : some rate regulating factors. *J. Biol. Chem.*, **233**, 355, 1958.
- J. GROSS, C.I. LEVENE and S. ORLOFF. Fragility of Extractable Collagen in the lathyrotic Chick Embryo. An Assay for lathyrogenic Agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **105**, 148, 1960.
- J. GROSS and Y. NAGAI. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**, 1197, 1965.
- K.H. GUSTAVSON. On the Chemistry of Collagen. *Fed. Proc.*, **23**, 3, 1964.
- C.J. HAMRE and V.L. YEAGER. Influence of muscle section on exostoses of lathyrict rats. *A.M.A. Arch. Pathol.*, **64**, 426, 1957.
- C.J. HAMRE and V.L. YEAGER. Influence of denervated muscles on exostoses of rats fed a sweet pea diet. *Arch. Pathol.*, **65**, 215, 1958.
- R.D. HARKNESS. Biological functions of collagen. *Biol. Rev.*, **36**, 399, 1961.
- H.A. HARTMANN and H.F. STICH. Psychopathologic symptoms induced by bis-aminopropionitrile. *Science*, **125**, 445, 1957.
- H.A. HARTMANN, J.J. LALICH and K. AKERT. Lesions in the anterior motor horn cells of rats after administration of bis-beta-cyanoethylamine. *J. Neuropath. and Exper. Neurol.*, **2**, 298, 1958.
- A.J. HODGE and F.O. SCHMITT. Interaction properties of sonically fragmented collagen macromolecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**, 418, 1958.
- R.J. HUETTNER and C.L. WHITMAN. Tissue changes occuring in the macaque rhesus monkey during orthodontic movement. *Amer. J. Orthodontics.*, **44**, 328, 1953.
- A. HULTH. Formation of new bone in osteolathyrism. An autoradiographic investigation. *Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, **339**, 372, 1965.

- D. JACKSON. Chondroitin sulfuric acid as a factor in the stability of tendon. *Biochem. J.*, **54**, 638, 1953.
- D.S. JACKSON and J.P. BENTLEY. On the significance of the extractable collagen. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, **7**, 37, 1960.
- C. JIMENEZ DIAZ, E. ORTIZ DE LANDAZURI et E. RODA. Estudios sobre latirismo ; síntesis de datos clínicos y experimentales para el conocimiento de la patogenia del latirismo. *Rev. Clin. Españ.*, **8**, 1954, 1943.
- K.I. KIVIRIKKO. Effect of Cortisone on Collagen Formation in the Chick Embryo. *Nature* (London), **197**, 385, 1963.
- KEECH. Electron microscopic studies of normal and lathyrin aorta. *J. Biochem. Biophys. Cytol.*, **7**, 533, 1960 (normal) ; **7**, 539, 1960 (lathyrin).
- G.W. KORTING, H. HOZMANN and B. MORSCHES. Enzymatic determination in serum of lathyrin and prednisone-treated lathyrin rats. *Nature*, **209**, 1130, 1966.
- R.E. KUHLMAN. Enzyme alterations in the epiphyseal plate of the rabbit resulting from aminoacetonitrile administration. *J. Bone and Joint Surg.*, (A) **43**, 669, 1961.
- J.J. LALICH. Production of aortic rupture in rats fed purified diets and beta-amino-propionitrile. *Arch. of Pathol.*, **61**, 520, 1956.
- J.J. LALICH. Role of Cyanoacetic acid in production of lathyrism in rats by beta-aminopropionitrile. *Science*, **3317**, 206, 1958.
- J.J. LALICH, B.D. BARNETT and H.R. BIRD. Production of Aortic Rupture in Turkey Poults fed Beta-aminopropionitrile. *A.M.A. Arch. of Pathol.*, **64**, 643, 1957.
- C.M. LAPIERE. *Remaniements du tissu conjonctif*. Maloine, Paris, 1968.
- C.I. LEVENE. Morphologic and chemical studies on lathyrism in the chick-embryo. *Fed. Proc.*, **17**, 445, 1958.
- C.I. LEVENE. Structural requirements for lathyrinogenic agents. *J. Exp. Med.*, **114**, 295, 1961.
- C.I. LEVENE and J. GROSS. Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by beta-aminopropionitrile (lathyrin factor). *J. Exp. Med.*, **110**, 771, 1959.
- B.M. LEVY. New Method for the rapid determination of lathyrinogenic agents. *Science*, **129**, 720, 1959.
- M.S. LEWIS and K.A. PIEZ. The characterization of collagen from the skin of the dog-fish shark, *aqualus acanthias*. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3, 336, 1964.
- S. LINDSTET and D.J. PROCTOR. Isotopic studies on urinary hydroxyproline as evidence for rapidly catabolized forms of collagen in the young rat. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1399, 1961.

- S.H. LIFTON, J.J. LALICH and F.M. STRONG. Identification of cyanoacetic acid as a metabolite of beta-aminopropionitrile (BAPN) and other nitriles. *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 2022, 1958.
- G.R. MARTIN and P. GOLDBABER. Action of aminoacetonitrile on bone collagen in tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta*, **69**, 568, 1963.
- G.R. MARTIN, J. GROSS, K.A. PIEZ and M.S. LEWIS. On the intramolecular cross-linking of collagen in lathyrus rats. *Biochem. Biophys. Acta*, **53**, 599, 1961.
- R.A. MILCH. Mechanical functions of compounds structurally analogous to ground-substance polysaccharides. *Birth Defects - Original Articles Series*, vol. II, April 1966, p. 35. The National Foundation N. Y., 1966.
- G. MINGAZZINI et G.B. BUGLIONI. Studio Clinico col Anatomico sul Laterismo. *Rev. Sper. Frenatr. ext.*, **22**, 79, 1896.
- P.D.F. MURRAY. *Bones*. Cambridge University Press. New York, 1936.
- D. MYHILL and D.S. JACKSON. Separation of Proline and Hydroxyproline Using Thin-Layer Chromatography. *Anal. Biochem.*, **6**, 193, 1963.
- J. NAGEOTTE. Sur le caillot artificiel de collagène: signification, morphologie générale et technique. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **96**, 172, 1927.
- R.E. NEUMAN and M.A. LOGAN. The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.*, **184**, 299, 1950.
- R.E. NEUMAN, M. MAXWELL and T.A. MCCOY. Production of beak and skeletal malformations of chick embryos by semi-carbazide. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **92**, 578, 1956.
- V.N. OREKHOVITCH. Les procollagènes, leur structure chimique et leur rôle biologique. *C. R. II^e Congrès International de Biochimie*, p. 106, 1952.
- V.N. OREKHOVITCH, V.O. CHPIKITER, V.J. MAZUROV et O.V. KOUNINA. Procollagène. Classification, métabolisme, action des protéinases. *Bulletin Soc. Chim. Biol.*, **42**, 505, 1960.
- S. ORLOFF and J. GROSS. Experimental lathyrism in the Chick embryo. *Journ. of Exper. Med.*, **117**, 1009, 1963.
- S. ORLOFF. *Third annual Meeting of Research Fellows*. Established Invest. The Helen Hay Whitney Foundation. New York, 1960, p. 40.
- S. ORLOFF. On the origin of the lathyrus soluble collagen. In: *Structure and Function of Skeletal and Connective Tissue*. Butterworths, London, 1966.
- R.C. PAGE and F.P. BENDITT. A Molecular Defect in Lathyrus Collagen. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **124**, 459, 1966.
- K.A. PIEZ. The aminoacid chemistry of some calcified tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **109**, 256, 1963.
- K.A. PIEZ. Cross-linking of collagen and elastin. *Ann. Rev. of Biochem.*, **37**, 547, 1968.

- K.A. PIEZ, M.S. LEWIS, G.R. MARTIN and J. GROSS. Subunits of the Collagen Molecule. *Biochem. Biophys. Acta*, **53**, 596, 1961.
- K.A. PIEZ, P. BORNSTEIN, M.S. LEWIS and G.R. MARTIN. The preparation and properties of single and cross linked chains from vertebrate collagens. In : *Structure and Function of Skeletal and Connective Tissue*. Butterworths, London, 1966.
- I.V. PONSETI and R.S. SHEPARD. Lesions of the skeleton and other mesodermal tissues in rats fed on sweet pea (*Lathyrus Odoratus*) seeds. *The J. of Bone and Joint Surg.*, **36A**, 1031, 1954.
- I.V. PONSETI, S. WAWZONEK, W.E. FRANKLIN, R.E. WINNICK and T. WINONICK. Distribution of C14 labeled aminoacetonitrile in tissues of rat, metabolism and mode of alimentation. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **93**, 515, 1956.
- R. PRAUS, I. BRETTSCHEIDER, M. HVEZDOVA and V. STERBOVA. The effect of lathyrogens on the cornea. The effect of beta aminopropionitrile on the sulphation of acid mucopolysaccharides of cornea *in vitro*. *Cs. oftal.*, **21**, 244, 1965.
- G.N. RAMACHANDRAN, V. SASISEKARAN and Y.T. TATKACHARI. Structure of collagen at the molecular level. In : *Collagen*. N. Ramanathan ed. p. 81, Interscience. New York, 1961.
- P. RAMAMURTI and H.E. TAYLOR. Histochemical studies of the evolution and regression of skeletal deformities due to BAPN. *Lab. Invest.*, **7**, 115, 1958.
- P. RAMAMURTI and H.E. TAYLOR. Skeletal lesions produced by semicarbazide and experimental analysis of the action of lathyrogenic compounds. *J. of Bone and Joint Surg.*, **41 B**, 590, 1959.
- CH. RESSLER. Isolation and identification from common vetch of the neurotoxin beta cyano-L-alanine, a possible factor in neurolathyrism. *J. Biol. Chem.*, **237**, 733, 1962.
- A. RICH and F.H. CRICK. The structure of collagen. In : *Recent advance in gelatin and in glue research*. Ed. G. Stains, by Pergamon, London, 1958.
- J.J. ROBINSON and T.M. BAST. Bone changes due to lathyrism in rats. *Anat. Rec.*, **59**, 283, 1934.
- M. ROJKIND and H. JUAREZ. The nature of the collagen defect in lathyrism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **25**, 481, 1966.
- E.E. ROSENBERG. Teratogenic effects of beta aminopropionitrile in the chick embryo. *Nature*, **180**, 706, 1957.
- R.B. RUCKER, J.C. ROGLER and H.E. PARKER. a) The partial characterization of an amine-oxydase in bone tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 1150, 1969.
- R.B. RUCKER, H.E. PARKER and J.C. ROGLER. b) The effect of copper on collagen cross-linking. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **34**, 28, 1969.
- H. SELYE. Lathyrism. *Rev. Canad. Biol.*, **16**, 1, 1957.

- F.O. SCHMITT and A.J. HODGE. The tropocollagen macromolecule and its properties of ordered interaction. *J. Soc. Leather Tr. Chem.*, **44**, 217, 1960.
- W. SCHOLZ. *Handbuch der speziellen Pathologische Anatomie und Histologie*. Nervensystem XIII 2^o Teil. Bandteil B p. 2341, Springer, Berlin, 1958.
- M. SHIMIGER, L. GOLUB and M. GLIMCHER. The effect of lathyrogens on the rate of collagen formation and dissolution. *Biochem. Biophys. Acta*, **168**, 356, 1968.
- D.J. SMITH and R.C. SHUSTER. Collagen Biosynthesis in Normal and Lathyrctic Chick Embryos. *Arch. Biochem and Biophys.*, **98**, 498, 1962.
- K.J. STALDER und H. STEGEMAN. Einbau von beta-aminopropionitril in die Kollagenmolekül beim Lathyrismus der Ratte. *Die Naturwissenschaften*, **49**, 398, 1962.
- F.W. STAMLER. Reproduction in rats fed Lathyrus peas or aminonitriles. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **90**, 394, 1955.
- I.Z. STEINBERG, W.F. HARRINGTON, A. BERGEN, M. SELA and E. KATCHALSKI. The Configurational Changes of Poly-L-proline in Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5263, 1960.
- R. STOCKMAN. Lathyrism. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **37**, 43, 1929.
- SZCZEPANSKI. Vergiftungserscheinungen bei Pferden nach Verabreichung von Platterbsen. *Ztschr. gr. Vet. kde.*, **25**, 267, 1913.
- M.L. TANZER and R.D. HUNT. Osteoclasts: organisation in chick embryo bone. *Science*, **141**, 1270, 1963.
- M.L. TANZER and R.D. HUNT. Experimental Lathyrism: An autoradiographic study. *The Journ. of Cell Biology*, **22**, 623, 1964.
- M.L. TANZER and J. GROSS. Collagen Metabolism in the Normal and Lathyrctic Chick. *J. Exp. Med.*, **119**, 275, 1964.
- M.L. TANZER, D. MONROE and J. GROSS. Inhibition of Collagen Intermolecular Cross-Linking by Thiosemicarbazide. *Biochemistry*, **5**, 1919, 1966.
- A.A. TUSTANOVSKY. On the proteins of the skin (en russe). *Biokhimiya*, **12**, 285, 1947.
- S. UDENFRIEND. Formation of Hydroxyproline in Collagen. *Science*, **152**, 1335, 1966.
- A. VAN DEN HOFF, On the Ossification Defect in Lathyrism. *Patbol. and Microb.*, **26**, 753, 1963.
- A. VAN DEN HOFF, C.I. LEVENE and J. GROSS. Morphological evidence for collagen changes in chick embryos treated with BAPN. *J. Exp. Med.*, **110**, 1017, 1959.
- A. VEIS and J.T. LEGOWIK. Interchain interactions in collagen fold formation. II. The thermodynamics of the refolding process. In: *Structure and Function of Connective and Skeletal Tissues*. G. Tristram, R. Harkness and S.F. Jackson ed., p. 70. Butterworths London 1966.

- VON HIPPEL and W.F. HARRINGTON. In : *Protein Structure and Function*. A Symposium. Brookhaven National Laboratory. Upton, 1960.
- N. WEISSMAN, G.S. SHIELDS and W.H. CARNES. Connective Tissue changes in aortas from Pigs on a Copper deficient diet. *Fed. Proc.*, **20**, 160, 1961.
- Z. T. WIRTSCHAFTER. Acid mucopolysaccharides in hispathogenesis of aortic aneurism in rats fed lathyrus odoratus. *Arch. Pathol.*, **64**, 577, 1957.
- E. WOLFF. Analyse des besoins nutritifs d'un organe embryonnaire, le syrinx d'oïseau, cultivé en milieu synthétique. *Arch. Anat. Microsc. et Morph. expér.*, **46**, 408, 1957.
- V.L. YEAGER and C.J. HAMRE. Histology of lathyrus induced exostoses of rats. The initial changes at tendon-bone junction. *Arch. Pathol.*, **64**, 171, 1957.
- V.L. YEAGER and M.F. BACH. Phosphorylase activity in periosteum and muscle of normal and lathyrus rats. *Proc. of the North Dakota Academy of Science*, Vol. XVI, p. 62, 1962.
- V.L. YEAGER and D.J. GUBLER. Protein Histochemistry of Lathyrus Periosteum *Arch. Pathol.*, **76**, 158, 1963.

