

Fondements et principes de la reproduction humaine

M. Etienne-Emile BAULIEU, membre de l'Institut,
(Académie des Sciences), professeur

I. COURS AU COLLÈGE DE FRANCE

L'enseignement a porté sur 2 thèmes distincts : Chaperons moléculaires et récepteurs des hormones stéroïdes, et Contraception masculine : données récentes et perspectives.

I.1. Protéines de choc thermique, chaperons moléculaires. Interactions physiques et fonctionnelles avec les récepteurs des hormones stéroïdes

Un environnement cellulaire non favorable, tel qu'une brusque élévation de la température ou un autre stress, stimule la synthèse de certaines protéines, appelées protéines de choc thermique (heat shock proteins : Hsps) ou protéines de stress. Cette réponse, qui accompagne la diminution de la synthèse de nombreuses autres protéines comme si les cellules voulaient concentrer leurs activités sur une meilleure résistance à l'agression, semble le fait de toutes les cellules dans tous les organismes : elle est à l'origine d'une défense accrue, plus ou moins prolongée, contre un nouveau stress. Les Hsps sont, pour la plupart, également exprimées en l'absence d'agression — bien qu'à des niveaux qui peuvent être très inférieurs, et cette expression constitutive suggère qu'elles ont aussi des fonctions importantes dans des conditions normales, selon des mécanismes moléculaires voisins ou identiques à ceux utilisés au cours du stress.

Les principales protéines de choc thermique sont très conservées chez tous les organismes, et on en distingue quatre familles selon leurs poids moléculaires et leurs homologies de séquence : les Hsps 70, ayant un poids moléculaire de 66 à 78 kDa et dénommées Hsp70 et BiP dans les cellules eucaryotes, et DnaK chez les procaryotes ; les Hsps90 (poids moléculaire de 82 à 110 kDa, appelées Hsp82 chez la levure, Hsp83 chez la drosophile, Hsp90 chez la plupart des autres cellules eucaryotes et HtpG chez les procaryotes ; les Hsps60 et TRiC (TCP1 ring Complex) chez les eucaryotes et GroEL chez les procaryotes, qui furent les pre-

mières à être appelées chaperons moléculaires ; et les petites Hsps, de 10 à 30 kDa de poids moléculaire. Toutes ces Hsps fonctionnent comme chaperons moléculaires en interagissant avec des protéines impliquées dans de très nombreux, pour ne pas dire la plupart, des processus liés à la croissance cellulaire telle que la synthèse d'ADN, à la transcription des gènes, la synthèse, le repliement et le transport des protéines, et le fonctionnement membranaire. Les mécanismes impliqués sont d'empêcher les agrégats indus, ce qui favorise la renaturation et le fonctionnement des protéines, ou de cibler vers la voie protéolytique des peptides endommagés. Dans chaque famille, on distingue les *hsps* elles-mêmes, dont l'expression est thermoinductible, et qui peuvent être ou non constitutivement synthétisées ; les *Hscs* (« heat shock cognates ») exprimées de manière constitutive et qui ne sont pas induites par la chaleur, mais dont les homologues avec les Hsps correspondantes sont très grandes ; et les *Grps* (« glucose regulated proteins ») exprimées de manière constitutive et induites par une carence en glucose et/ou une augmentation du taux de calcium intracellulaire et certains inhibiteurs de la glycosylation, qui ont également une grande homologie de séquence avec les Hsps.

La *régulation* de l'expression des gènes de choc thermique se fait à différents niveaux, transcriptionnel et post-transcriptionnel. Presque exclusivement transcriptionnelle chez *E. Coli*, la réponse de choc thermique chez les eucaryotes supérieurs est contrôlée à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Toutes les cellules eucaryotes possèdent au moins deux protéines dans chaque famille, l'une régulée par le stress (Hsp) et l'autre exprimée consécutivement (Hsc). Chez les procaryotes le promoteur des gènes de choc thermique est reconnu par l'ARN polymérase associé à σ^{32} , sous-unité spécifique jouant un rôle actif et complexe dans la régulation, et interagissant avec certaines Hsps pour moduler la réponse. De fait, σ^{32} n'est pas l'unique facteur σ impliqué dans la régulation. Tous les gènes de choc thermique des eucaryotes sont régulés au niveau de la transcription. L'élément cis-activateur HSE (« Heat Shock Element ») au niveau de l'ADN reconnaît le facteur de transcription HSF (« Heat Shock Factor »). Les séquences de HSE se composent de plusieurs séquences de 5 pb 5'-nGAAn-3' et sont très conservées. Les HSFs connues varient selon les espèces, sauf au niveau de leur séquence impliquée dans la liaison à l'ADN et dans la trimérisation nécessaire (dans la partie N-terminale). Le promoteur des Hsps inclut généralement une boîte TATA, une boîte CAAT, et une séquence de liaison pour le facteur Spl qui sont regroupés de façon variable, y compris quand il s'agit de la même protéine dans différentes espèces. Une action post-transcriptionnelle s'exerce au cours du choc thermique et au cours de la récupération qui lui fait suite, au niveau de l'épissage des ARNs messagers, de leur dégradation sélective et de leur traduction préférentielle. Le mécanisme du blocage de l'épissage du messager peut orienter la synthèse des Hsps de manière sélective. On a identifié une séquence responsable de l'augmentation de la stabilité du messager pendant l'hyperthermie dans une région en 3' non traduite.

1.1.1. La protéine de choc thermique hsp90

Hsp90, beaucoup moins étudiée qu'Hsp70 et Hsp60, est de grand intérêt. La participation de l'ATP aux mécanismes moléculaires à laquelle elle contribue n'est pas démontrée. C'est l'interaction particulière de l'Hsp90 avec des substrats spécifiques qui, à présent, retient le plus l'attention, la nôtre en particulier, puisque c'est dans le laboratoire de Bicêtre que fût découvert son interaction avec les récepteurs des hormones stéroïdes, introduisant ainsi la Hsp90 dans un système de régulation cellulaire physiologique.

Hsp90 est une protéine acide (pI = 5,2), dimérique, *ubiquitaire*, *abondante* (~ 1 % des protéines totales très souvent) dans les cellules normales. Elle est essentiellement cytoplasmique, exprimée dans tous les types cellulaires constitutivement et surexprimée après une élévation de température ou un stress. Une translocation nucléaire a été observée chez les cellules soumises à un choc thermique et il peut se produire dans d'autres circonstances physiologiques, au cours de l'ovogénèse ou sous l'effet des stéroïdes.

Chez *E. Coli*, HtpG a une identité de 40 % avec les Hsps90 d'eucaryotes. Plus petite (71,4 kDa), il lui manque environ 50 acides aminés hydrophiles dans la partie terminale du domaine correspondant à la zone A (voir plus loin) et environ 35 acides aminés en C-terminal. Ce n'est pas une protéine essentielle. Dans la levure *S. Cerevisiae*, il y a deux Hsps90 dont la double délétion est létale. Chez les vertébrés, deux gènes codant pour des Hsps90 ont été clonés dans chaque espèce, ainsi qu'un gène codant pour une grp apparentée. Les deux gènes codent pour deux isoformes très proches (Hsp90 α et Hsp90 β — 86 % d'identité) qui dérivent d'un gène ancestral commun dont la duplication a eu lieu au cours de la phylogénèse, peu de temps avant l'apparition des téléostéens. L'identité est plus grande entre une même isoforme (α ou β) à travers les espèces qu'entre deux isoformes au sein d'une même espèce. Chez le poulet, Hsp90 α est inducible par la chaleur, au contraire de Hsp90 β .

Hsp90 est surexprimée au cours du développement embryonnaire précoce chez la souris, dans les cellules germinales en prophase méiotique, sous l'effet des œstrogènes dans l'utérus, au cours de la différenciation dans les glandes mammaires pendant la grossesse et la lactation, etc. L'Hsp90 α de poulet est stimulée par le sérum et plusieurs facteurs de croissance, et son accumulation accrue au cours du cycle cellulaire à la jonction G₁/S. Les nombreux pseudogènes des Hsps s'opposent au succès des méthodes habituelles de knock-out qui permettraient d'approfondir les mécanismes impliquant les Hsps90.

Malgré la détermination de la séquence des Hsps90, leur structure tridimensionnelle est mal connue. Chez les vertébrés, les Hsps90 possèdent deux régions chargées, l'une centrée sur l'acide aminé 250 la région A (entre aa 221-290) (chez le poulet, que nous avons surtout étudié ; les acides aminés correspondants sont faciles à repérer dans les protéines d'autres espèces), et la région B, centrée sur l'acide aminé 550 (entre aa 530-581). La région A, la plus chargée, manque dans

HtpG. Sa structure est prédite en hélice α chargée négativement et modélisable en segment « DNA-like ». Elle pourrait contribuer ainsi au masquage du domaine de liaison à l'ADN des récepteurs des stéroïdes et de la dioxine qui sont chargés positivement, et donc à leur maintien dans un état inactif. Trois régions Leucine Zipper (LZ) ont été repérées, qui pourraient participer à la formation et à la stabilisation du dimère. Celui-ci est très stable et ne peut être dissocié ni par élévation de la concentration saline ni par de ions chaotropiques. Les formes dimériques majoritaires sont homodimériques, mais selon des modalités inconnues, qui ne permettent l'interaction du dimère qu'avec une seule molécule d'anticorps monoclonal ; les derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale jouent un rôle important dans la formation et/ou la stabilité du dimère, et on a pu montrer qu'une délétion affectant la dimérisation affectait également la viabilité cellulaire chez la levure.

1.1.2. Interactions de la Hsp90 et de protéines cellulaires : aspects fonctionnels

Comme d'autres protéines de choc thermique, Hsp90 est un chaperon moléculaire pouvant jouer un rôle de protection et/ou de restructuration de protéines cellulaires. A la température normale, ces chaperons moléculaires favorisent le repliement, l'assemblage oligomérique et la translocation des polypeptides en stabilisant des formes intermédiaires et en évitant des interactions inappropriées. A haute température, les protéines de choc thermique sont exprimées à un taux plus élevé, et elles évitent les agrégations des protéines dénaturées en facilitant leur repliement. In vitro, les études de Wiech, Myata et Yahara, Jakob et leurs collaborateurs, sur la caséine kinase II et la citrate synthetase en particulier, ont bien montré la compétence « chaperon » de la Hsp90 (en l'absence de l'intervention d'ATP). Dans quelle mesure ces résultats sont applicables in vivo et à d'autres protéines qui jouent un rôle important fonctionnel dans la cellule entière ? On ne le sait pas encore, mais ces systèmes modèles suggèrent un mécanisme d'interaction fonctionnelle d'Hsp90 avec de nombreuses protéines.

De fait, Hsp90 interagit avec plusieurs protéines régulatrices et de structure déjà bien décrite : les récepteurs des hormones stéroïdes (mais *pas* d'autres récepteurs intracellulaires se liant à l'ADN de la même « superfamille », tels que les récepteurs des hormones thyroïdiennes et ceux des métabolites actifs de la vitamine D et des rétinoïdes), le récepteur de la dioxine, les protéines virales transformantes de la famille pp60^{v-src}, la protéine kinase du facteur d'élongation eIE2 α , la caseine kinase II déjà citée, la protéine kinase Raf, le récepteur *Sevenless* de la drosophile, et la tyrosine kinase Wee1 de *S.pombe*. Les interactions physiques démontrées avec la calmoduline, l'actine et la tubuline, l'immunophiline p59-HBI et la cyclophiline Cyp-40 n'ont pas encore de contrepartie fonctionnelle.

Plusieurs de ces exemples sont particulièrement intéressants, tant sur le plan fonctionnel que pour illustrer la complexité des interactions protéine/protéine.

Dans la plupart des cas, la question s'est posée d'une interaction de l'ATP. Les sites de liaison de l'ATP n'ont pas été définis avec précision, et l'activité ATPase de l'Hsp90 est un sujet encore très controversé : la réaction enzymatique a été observée avec la Hsp90 du trypanosome, mais il y a des variations très importantes d'activité selon l'espèce et elle est loin d'être démontrée pour la protéine humaine. Certains ont suggéré que l'Hsp90 pouvait s'autophosphoryler très lentement, en utilisant un phosphate à la suite de l'effet ATPase. D'autres pensent que dans les expériences présentées, il y avait copurification possible d'une protéine kinase encore indéterminée.

L'effet de solubilisation et d'activation fonctionnelle de la *caséine kinase II* pourrait être dû à une activité de désagrégation ou d'empêchement de l'agrégation. On note, sans en comprendre la raison, qu'il faut beaucoup plus de molécules d'Hsp90 que de molécules d'enzyme pour obtenir un effet notable.

L'étude de *MyoD*, un facteur de transcription phosphorylé que l'on peut exprimer dans les fibroblastes, est intéressant du fait de son activité biologique et de la structure bHLH (basic-helix-loop-helix) au niveau de laquelle il se lie à l'ADN. Les deux hélices concourent à la dimérisation du facteur, qui n'est pas actif quand il est complexé à Hsp90. La Hsp doit être relarguée pour que se fasse la dimérisation. La région d'interaction de *MyoD* avec Hsp90 correspond à une cinquantaine d'acides aminés en C-terminal (correspondant aux acides aminés 647-694 de l'Hsp90 α de poulet). Le mécanisme de la dissociation de l'association *MyoD*-Hsp90 est inconnu, mais on sait que l'ATP n'y joue pas de rôle.

Une autre protéine pour laquelle Hsp90 est fonctionnellement importante, est le *récepteur pour la dioxine*, composé toxique qui a fait malheureusement la une des journaux il y a quelques années. On l'appelle encore récepteur pour des aryl hydrocarbures (Ah-R). Parmi les toxiques qui sont liés, on remarque le TCBB (2, 3, 7, 8 — tetrachloro - dibenzo - t-dioxine), qui a des effets cancérogènes. Le récepteur, qui comprend une séquence bHLH, agit au niveau cellulaire par interaction avec un segment X (xénobiotique) RE (response element) dans le promoteur de gènes régulés. La forme latente fonctionnellement est liée à l'Hsp90, que le ligand toxique tend à séparer. La réponse inclut l'induction de la synthèse d'un cytochrome P450 (a1) qui hydroxyle les aryl hydrocarbures toxiques. Ah-R, après la séparation de la Hsp90, interagit avec une autre protéine également bHLH, qui permet le transfert au noyau. Comme dans le cas des récepteurs des hormones stéroïdes, les domaines de liaison ligand (toxique) et de la Hsp90 sont situés, au moins en partie, dans la même région de la protéine.

Les *récepteurs des hormones stéroïdes* présents dans les extraits solubles obtenus à faible concentration ionique à partir des cellules cibles se présentent sous forme de complexes incluant un dimère d'Hsp90. Les techniques de biochimie et de génétique moléculaire ont permis de démontrer que le LBD (ligand binding domain) était en interaction avec l'Hsp90. De plus, la protéine de choc thermique interagit avec une zone chargée positivement qui s'étend sur les par-

ties C-terminale du DBD (DNA binding domain) et N-terminale de la zone charnière (hinge), ce qui peut être démontré directement pour le récepteur des œstrogènes. La zone chargée A de l'Hsp90 est potentiellement candidate pour cette interaction, et des expériences utilisant des mutants de délétion de l'Hsp90 s'accordent avec cette hypothèse, y compris pour les récepteurs des minéralocorticostéroïdes et des glucocorticostéroïdes. D'autres techniques sont en cours d'utilisation pour étudier cette question.

Les complexes entre récepteurs des hormones stéroïdes et Hsp90 n'interagissent pas avec les HREs (hormone response elements) correspondants. Toute une série de recherches, *in vitro* et *in vivo*, tendent à démontrer que le signal de la séparation des récepteurs et de la protéine de choc thermique est la liaison du ligand, qui destabilise leur interaction, probablement du fait d'un changement de conformation. Le récepteur libéré du complexe hétéro-oligomérique peut ensuite interagir avec les HREs correspondants au niveau des gènes régulés. Les expériences utilisant des formes purifiées du récepteur et d'Hsp90 ont pu mettre en évidence la compétition entre les liaisons du récepteur avec cette dernière et avec un HRE, comme s'il y avait un équilibre entre la formation des complexes récepteurs-Hsp et récepteurs-ADN qui pourrait intervenir dans la régulation de la transcription. A ce niveau, le potentiel de régulation de la transcription par Hsp90 dépendrait de la concentration de la protéine Hsp90 et peut-être du changement de son affinité pour le récepteur à la suite de modification(s) post-traductionnelle(s), par phosphorylation de la protéine par exemple. Tous les récepteurs des hormones stéroïdes ne se comportent pas de façon identique dans leurs interactions avec Hsp90. Par exemple, l'interaction du récepteur des œstrogènes semble plus faible que celle du récepteur de la progestérone, et des expériences suggèrent qu'une partie du récepteur des œstrogènes, libre de ligand, se trouve en partie lié à des EREs (estrogen response elements) de gènes régulés dans les cellules cibles. On a déjà évoqué le fait que d'autres membres de la même famille de récepteurs intranucléaires, interagissant avec l'ADN, ne lient pas Hsp90. En plus des récepteurs des dérivés actifs des vitamines D et A, toute une série de protéines de structure voisine, souvent appelées « récepteurs orphelins » est dans ce cas.

Compte tenu de la concentration élevée d'Hsp90, particulièrement si on la compare à celle des récepteurs hormonaux, compte tenu également de l'extrême labilité des associations récepteurs-Hsp, beaucoup d'auteurs ont évoqué la possibilité que les complexes récepteurs-Hsp90 décrits dans les extraits cytosol des organes cibles étaient des artéfacts, la combinaison se faisant *in vitro*, favorisée artificiellement par la faible force ionique du milieu, alors que la dissociation peut se faire même en l'absence d'hormone sous l'effet d'une augmentation de la force ionique et/ou de la température à des niveaux voisins de ceux réalisés physiologiquement.

Une démonstration claire de la réalité des complexes récepteur-Hsp90 intracellulaires, plus convaincante que les résultats obtenus à la suite de manipula-

tions d'extraction rapide, a pu être obtenue en utilisant les méthodes de pontage chimique intracellulaire et par une étude de biologie cellulaire utilisant des techniques de génétique moléculaire. La démonstration qui semble décisive résulte de manipulations mettant en rapport, après transfection, un récepteur n'ayant aucune possibilité de localisation intranucléaire [par délétion spécifique des zones NLS (nuclear localization signals)] et Hsp90 rendue transférable dans le noyau par l'adjonction d'un puissant NLS (celui de la nucléoplasmine). La lecture des résultats s'est faite grâce à la caractérisation spécifique d'une Hsp transfectée d'autres origines, à l'aide d'un anticorps spécifique, et en utilisant des concentrations de protéines appropriées, telles que les interactions puissent être suffisantes pour être visualisées par la microscopie confocale, tout en répondant à des normes physiologiques. L'expression conjointe de récepteur purement cytoplasmiques et d'une Hsp à tropisme nucléaire a ainsi montré, en marquant différemment les deux protéines, que la Hsp entraînait le récepteur dans le noyau, par là suggérant et même prouvant l'interaction et également le fonctionnement de l'interaction entre les deux protéines. A ces expériences utilisant des protéines modifiées, s'en sont ajoutées d'autres avec des protéines intactes, utilisant la propriété de l'Hsp90 d'être essentiellement cytoplasmique et celle de certains récepteurs d'être quasi exclusivement nucléaires, et dans ce cas d'entraîner une partie de l'Hsp90 dans le noyau.

On peut reconnaître trois types de fonctions à l'interaction Hsp90-récepteur. La première, déjà évoquée implicitement, est de bloquer, en l'absence d'hormone, l'interaction possible du récepteur avec l'ADN. La seconde est de stabiliser la structure permettant la liaison hormonale du récepteur, en particulier dans le cas des récepteurs des gluco- et des minéralocorticostéroïdes dont le LBD n'est pas fonctionnel en l'absence de liaison de l'Hsp90. A cette double fonction de blocages-stabilisation, s'ajoute une propriété démontrée dans les laboratoires de Susan Lindquist et Keith Yamamoto, en utilisant la très versatile génétique de levure. Dans les cellules dont la teneur en Hsp90 a été diminuée au minimum encore compatible avec leur survie (voir plus haut), et après expression de récepteurs des hormones stéroïdes suivant la transfection des DNA correspondants, une diminution notable de l'activité de transactivation hormono-dépendante est observée. L'étape et le mécanisme précis de cette activité positive de l'Hsp90 sur le fonctionnement des récepteurs n'est pas encore bien définie, mais elle répond globalement à la notion de chaperonage. Des études ont été faites avec la pp60^{v-src} dans le même système de levure en modulant la concentration de Hsp90, et la fonction « positive » de l'Hsp90 confirmée avec cet oncogène.

Dans les complexes hétéro-oligomériques incluant le récepteur non activé des hormones stéroïdes, on note dans certains cas la présence de la protéine de choc thermique *Hsp70*. D'autres protéines ont été également caractérisées. Les expériences de reconstitution des complexes hétéro-oligomériques ont été réalisées, tout particulièrement en utilisant le système de réticulocytes utilisé dans les études de synthèse des protéines in vitro. Parmi les composés mis en évidence et

les interactions qui ont été décrites, il faut citer une protéine *p23*, découverte par le groupe de David Toft, qui semble indispensable dans un certain nombre de modalités expérimentales permettant d'obtenir in vitro la reconstitution des complexes récepteurs. Sa structure n'est pas connue. Une autre série d'observations importantes indique que l'interaction de Hsp90 avec d'autres protéines de choc thermique et en particulier Hsp70, ne nécessite pas la présence de récepteur, et le fonctionnement et le rôle de ces complexes de plusieurs protéines de type Hsps restent inconnus. On a évoqué un « partage des tâches » qui attribuerait un effet de chaperonage de la structure par l'Hsp90 et un effet sur la distribution subcellulaire des protéines par l'Hsp70, qui dépendrait de l'ATP. Enfin, l'interaction de Hsp90 avec deux *immunophilines*, FKBP59 et Cyp40, qui se fait en toute probabilité avec la participation du domaine TPR (tetratricopeptid repeat) de ces immunophilines de grande taille, évoque une autre activité de carrefour métabolique pour Hsp90, compte-tenu des interactions propres à ces immunophilines et de la description des complexes immunophiline-Hsp90-récepteur. Les expériences fonctionnelles qui démontrent l'effet des immunosuppresseurs sur le fonctionnement des récepteurs stéroïdiens doivent ainsi être discutées en fonction de l'observation de ces interactions protéine-protéine, sans qu'on puisse encore y voir des rapports de cause à effet, d'autres hypothèses étant possibles du fait des impacts multiples des médicaments.

1.2. Contraception masculine : données récentes et perspectives

Un grand enjeu : donner aux hommes les moyens d'une contraception, efficace et sûre. Par là même, on modifiera l'inégalité qui fait qu'actuellement les femmes ont presque exclusivement la responsabilité des pratiques contraceptives. Les problèmes biologiques qui se posent sont difficiles, on le sait déjà. Les questions de société le seront aussi, on le pressent.

1.2.1. Rappels physiologiques

Les *spermatozoïdes* se différencient à partir de cellules germinales souches, les spermatogonies, dans les *tubes séminifères* qui composent la plus grande partie des testicules. Ils sont évacués, via l'épididyme, vers le canal excréteur déférent. La biosynthèse des spermatozoïdes est extrêmement complexe, aboutissant à la formation des cellules haploïdes ayant un appareil permettant leur mobilité très particulière. Dans les tubes séminifères, la progression à partir des cellules souches *spermatogonies* jusqu'aux spermatozoïdes définitifs dure 74 jours chez l'homme. Il y a de véritables *vagues de synthèse* coordonnées qui se déclenchent tous les 16 jours environ, ce qui fait que l'on peut observer sur les coupes de testicule adulte, 4 à 5 séries de cellules au même stade (Fig. 1).

De l'extérieur des tubes vers leur lumière, le parcours se fait en étroite connexion avec les *cellules de Sertoli*, grandes cellules qui jouent un rôle extrêmement important dans la progression des cellules germinales en développement, en res-

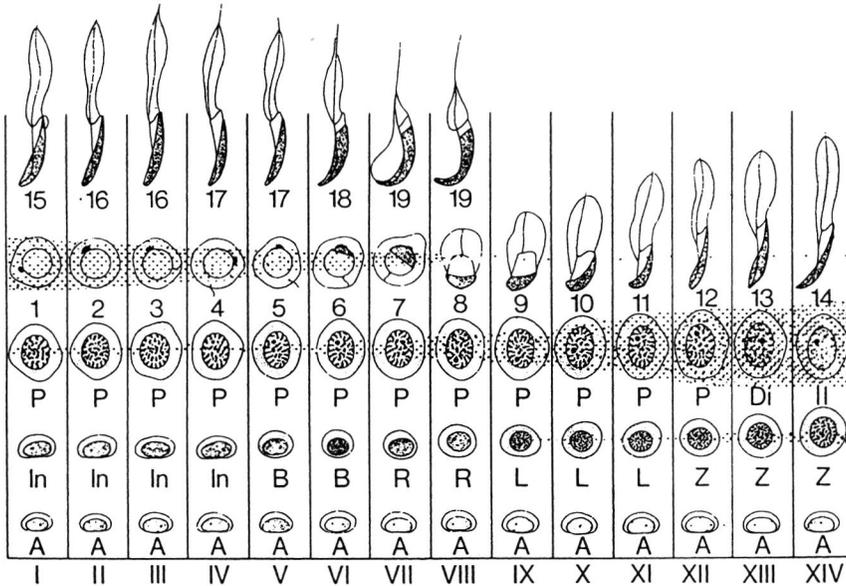


Figure 1. Spermatogenèse chez le rat. Quatorze arrangements cellulaires peuvent être observés sur les coupes de tubes séminifères. Chacun, numéroté par un nombre en chiffre romain, inclut des cellules : A, B, et In : spermatogonies de type A, B et intermédiaire ; R, L, Z, P et Di : spermatoctyes primaires aux stades de repos, leptotène, zygotène, pachytène and diplotène ou diacinèse ; II, spermatoctye secondaire ; 1-19 : stades de la spermiogenèse (classification de B. Perey, Y. Clermont et C.P. Leblond. The waves of the seminiferous epithelium in the rat. Am. J. Anat. 108, 47-77, 1961 ; les pointillés indiquent la détection de l'ARN messenger de la protéine FKBP59 à des stades privilégiés de l'évolution selon un travail non publié avec C. Le Goascogne et N. Sananès. Chez l'homme, les arrangements cellulaires sont moins systématiques, et plusieurs arrangements peuvent apparaître sur la même coupe histologique.

tant à leur contact (Fig. 2). Au début, les cellules souches se divisent mitotiquement. Elle sont reliées les unes aux autres, formant la « barrière hémato-testiculaire ». Ainsi seront isolés les précurseurs haploïdes des spermatozoïdes de la circulation générale et de l'essentiel du système immunitaire. A contrario, quand pour une raison ou pour une autre il n'y a plus cette barrière, il y a formation d'anticorps anti-spermatozoïdes dans l'organisme.

Parmi les facteurs hormonaux ou parahormonaux impliqués dans la spermatogenèse, on cite en premier la *testostérone*, dont la biosynthèse se fait au niveau des cellules de Leydig, cellules interstitielles disposées entre les tubes séminifères dont le produit stéroïde accède facilement, par diffusion, aux cellules de Sertoli et aux cellules germinales en développement. Les cellules de Leydig synthétisent une très petite quantité d'œstrogènes, mais les cellules de Sertoli ont une activité aromatasase (transformant la testostérone en œstrogènes) plus importante, quoique de signification biologique inconnue. La testostérone est sécrétée sous la dépendance d'une glycoprotéine hormonale hypophysaire, LH (identique à

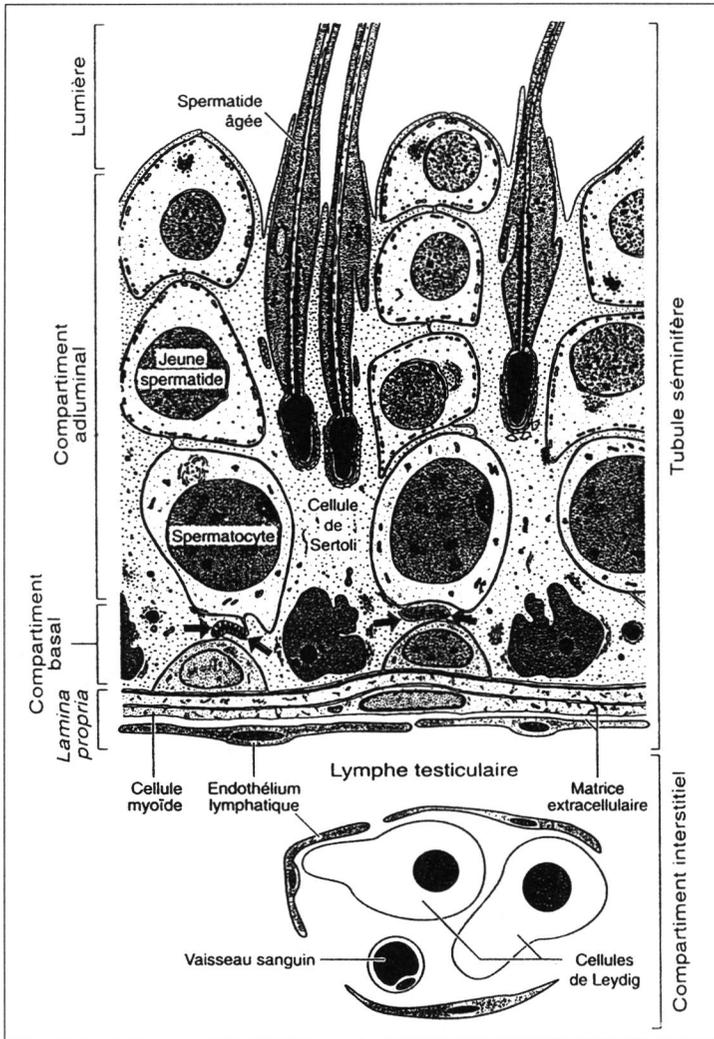


Figure 2. Représentation schématique d'une portion de tubule séminifère et des relations entre le compartiment interstitiel contenant les cellules de Leydig productrices de testostérone et les vaisseaux sanguins et lymphatiques. La coupe du tubule fait apparaître l'extraordinaire intrication des différents types cellulaires qui le compose et la position « pivot » de la cellule de Sertoli. Les flèches, situées à l'intérieur du tubule, indiquent la situation des jonctions serrées intersertoliennes qui délimitent le compartiment basal, dans lequel se situent les spermatogonies et les jeunes spermatocytes primaires non représentés sur ce schéma, et le compartiment adluminal contenant les spermatoocytes plus âgés et les spermatides. Les tailles relatives des différents types cellulaires ne sont pas respectées dans ce schéma. (D'après L.D. Russel. Normal testicular structure and methods for evaluation under experimental and disruptive conditions. In : Reproductive Developmental Toxicity of Metals. New York : Plenum Press, 227-252, 1983 ; et B. Jegou, C. Pineau et A. Dupaix. La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. Médecine/Science, 11, 519-527, 1995).

l'hormone lutéinisante de la femme). L'autre glycoprotéine hormonale sexuelle hypophysaire, FSH (identique à l'hormone folliculo-stimulante de la femme), a des récepteurs au niveau des cellules de Sertoli et elles jouent un rôle important dans les divisions cellulaires des spermatogonies et probablement aussi des spermatocytes. FSH contrôlerait aussi l'activité de transformation de la testostérone en œstrogènes par les cellules de Sertoli. Ces dernières synthétisent de nombreux produits peptidiques, et en particulier une protéine qui lie la testostérone avec haute affinité et grande spécificité, et qui est sécrétée dans la lumière des canaux séminifères. C'est une glycoprotéine, très analogue à une protéine du sang, liant androgènes et œstrogènes, et synthétisée par le foie, la *SBP* (sex steroid binding plasma protein, encore appelée *TEBG* : testosterone-estradiol binding globulin) ; on dénomme la protéine du liquide spermatique *ABP* pour androgen binding protein, et la distinction entre *ABP* et *SBP* tient seulement à la différence de glycosylation. Le rôle de l'*ABP* pourrait être de transporter de la testostérone par voie canaliculaire jusqu'à l'épithélium de l'épididyme, dont le fonctionnement dépend en partie du stéroïde. Il est important de noter que la concentration de testostérone dans les testicules est très supérieure à celle observée dans le sang circulant, qui dépend de la sécrétion de la testostérone dans le système veineux testiculaire et donc la circulation cave générale. On a pu démontrer que la concentration de la testostérone dans le compartiment où s'effectue la spermatogenèse était très élevée, et que cette testostérone « paracrine » avait une fonction physiologique : chez des sujets qui, par défaut hypophysaire, ne produisent pas de testostérone au niveau des cellules de Leydig, l'administration de testostérone par voie générale n'a pas d'effet sur la spermatogenèse si elle est du même ordre que la production physiologique du stéroïde : en d'autres termes, elle n'est pas suffisante pour établir au niveau des tubes séminifères une concentration efficace, au contraire de la testostérone qui diffuse directement des cellules de Leydig voisines. Chez les mêmes individus, l'administration de LH ou d'une préparation hormonale équivalente peut provoquer la reprise de la spermatogenèse, l'effet s'accomplissant par l'intermédiaire de la stimulation des cellules de Leydig qui produisent de la testostérone au voisinage des tubes séminifères et permettent ainsi une concentration locale plus élevée qu'après l'administration de l'hormone par voie générale. Il s'agit donc d'un exemple remarquable de la compartimentalisation de la distribution d'une hormone, impliquant deux mécanismes différents, celui des effets de la testostérone hormonale (les récepteurs intracellulaires), et celui, encore mal défini, de la testostérone paracrine agissant sur la spermatogenèse. La complexité du système s'accroît encore quand on énumère les nombreux peptides stimulateurs et inhibiteurs sécrétés par les cellules de Leydig et de Sertoli. On peut les diviser en deux catégories. D'une part les peptides qui agissent principalement (d'après les données actuelles en tout cas) au niveau hypophysaire ou hypothalamo-hypophysaire, et par conséquent empruntent le courant sanguin : l'*inhibine*, synthétisée par les cellules de Sertoli, est un peptide très actif dont l'effet au niveau des

cellules gonadotropes hypophysaires se fait principalement au niveau de la production de FSH qu'elle diminue ; cependant, selon les doses et les espèces animales, LH peut être également déprimée. L'inhibine est un peptide formé de deux sous-unités, α et β . Elle appartient à la famille des composés dont le TGF β est le plus connu. Tout à fait remarquablement l'homodimère $\beta 1 \beta 2$, composé de deux isoformes d'ailleurs très voisines, est l'« *activine* », ayant une activité de régulation positive spécifique sur la synthèse de FSH. On pense actuellement que la régulation de FSH dépend principalement de l'activine. Les récepteurs de l'inhibine et de l'activine ont été caractérisés. L'autre catégorie de peptides inclut des produits agissant principalement à partir de leur production par les cellules de Sertoli, sur le trophisme et le fonctionnement des cellules de Leydig ; il existe d'ailleurs des facteurs qui sont transférés dans le sens opposé, des cellules de Leydig aux cellules de Sertoli. Toute une série de cytokines a ainsi été mise en évidence et même la présence de GnRH dont l'effet de stimulation des hormones gonadotropes est bien connu et qui est par ailleurs un produit hypothalamique. La régulation et la signification physiologique de tous ces peptides est encore à l'étude. Par conséquent, l'intervention pharmacologique selon leur production ou leur action reste encore du domaine de l'hypothèse.

La structure des spermatozoïdes est très particulière. On sait que leur forme et leur taille varient beaucoup selon les espèces animales, sans que l'on comprenne pourquoi. Cependant le principe de leur anatomie générale est toujours semblable : le noyau dans la tête inclut un génome haploïde, et il est entouré de membranes apparentées au réseau de Golgi, qui vont jouer un rôle important dans la confluence avec la membrane plasmique de l'ovocyte qui s'établit lors de la fécondation. Leur ensemble définit l'*ascrosome*, qui comme son nom l'indique est une extrémité du corps de la cellule. Comme le réseau de membranes contient des protéines enzymatiques importantes pour permettre l'amarrage et la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte, cette extrémité cellulaire est tout à fait capitale, le reste du spermatozoïde s'effilant en une queue mobile qui inclut un système protéique assurant un mouvement flagellaire de différents types. Les ions calcium jouent un rôle extrêmement important dans la cohésion de l'appareil moteur et la mobilité elle-même, et de très nombreuses mitochondries disposées suivant un système spiralé très étonnant, fournissent l'énergie nécessaire. Classiquement, on a considéré, sur les résultats d'un certain nombre d'expériences chez l'animal, que les spermatozoïdes, même complets apparemment, qui se rassemblent au niveau de regroupement des tubules (rete testis) n'étaient pas féconds. C'est possible et même probable dans les conditions physiologiques, mais les études récentes injectant dans l'œuf humain un spermatozoïde prélevé à ce niveau ont montré sa capacité de fécondation. Cette manœuvre d'injection est un raccourci considérable puisque physiologiquement les spermatozoïdes, après leur parcours testiculaire, entrent dans l'*épididyme* qui, bien que ramassée en un organe de quelques 4-5 centimètres à la surface du testicule, correspond à environ 6 mètres d'un tube de 1/10^e de millimètre de diamètre dont l'épithélium est

extrêmement actif. L'acquisition de la mobilité, la modification des charges électriques de surface, et l'augmentation du pouvoir de fécondation correspondraient aux propriétés de protéines ajoutées ou soustraites au spermatozoïde au cours du transfert dans l'épididyme. Ceci correspond classiquement à « l'activation » des spermatozoïdes, maintenant prêts à être « capités » dans les voies génitales féminines. Incidemment on peut noter qu'à la jonction entre l'épididyme et le déférent, une région de stockage permet de conserver des spermatozoïdes suffisant pour plusieurs éjaculations. Après l'épididyme, le liquide spermatique est modifié et contient de la carnitine. L'ordre de grandeur de la durée de la traversée de l'épididyme est de quelques jours.

Les produits de sécrétion des vésicules séminales et de la prostate, qui vont se joindre au liquide spermatique, permettent par leur nature un apport énergétique aux spermatozoïdes et une certaine protection dans le tractus génital féminin. Les prostaglandines du sperme permettent, chez certains animaux, une réponse de contraction du myomètre utérin facilitant l'aspiration du sperme et l'ascension des spermatozoïdes. On discute d'ailleurs l'importance de la mobilité des spermatozoïdes dans l'accès de ceux-ci à la zone tubaire au niveau de laquelle se fera la fécondation, des expériences chez des rongeurs ayant indiqué que des particules de matériel inerte pouvaient également progresser assez rapidement de bas en haut dans les voies génitales femelles.

1.2.2. Méthodes « mécaniques » de contraception

Les *préservatifs* ont une histoire de plusieurs siècles, avec des différences selon les civilisations et les possibilités techniques. Les matériaux plastiques contemporains ont évidemment permis des progrès en rendant possible l'utilisation de membranes fines, imperméables et solides. L'actualité du SIDA a rendu le préservatif, dont la difficulté d'utilisation est en partie responsable de son caractère imparfait comme moyen de contraception, d'une importance extrême, symbolique et pratique. L'adjonction de lubrifiants à pouvoir spermicide et éventuellement viricide est à l'ordre du jour.

La *vasectomie* englobe sous sa désignation, dérivée de l'anglais selon une traduction très approximative (vas : déférent, ectomie : ablation), toutes les méthodes interrompant la continuité du canal déférent, qu'il y ait section avec ou sans ablation d'une partie du conduit, ou simplement ligature ou obturation par un produit chimique. Pour éviter une tension douloureuse testiculaire, la plupart des médecins conseillent de laisser ouverte l'extrémité du déférent provenant du testicule, et par conséquent il y a accumulation de spermatozoïdes à l'extérieur du système canaliculaire génital, avec pour conséquence, pratiquement toujours la formation d'anticorps anti-spermatozoïdes, même si la résorption du sperme et la destruction des spermatozoïdes se fait assez rapidement.

La vasectomie est la méthode de contraception la plus utilisée chez les hommes, plus de 120 millions dans le monde. En Chine, elle est très pratiquée,

et dans certaines régions, les opérateurs sont capables de provoquer une section après introduction d'un trocard transformant l'intervention en une sorte de piqûre sans danger tout à fait acceptable sous anesthésie locale. De nombreuses méthodes de ligature, d'électro-coagulation et d'oblitération plastique (acrylate plus ou moins réversible) ont été mises au point. Aux Etats-Unis, on estime à 10 à 15 % des hommes qui subissent cette stérilisation par vasectomie. La technique est bien supportée sur le plan médical, les modifications immunologiques sont tolérées sans complication, il n'y a pas de troubles de la virilité, et la crainte d'augmentation des tumeurs malignes de la prostate n'a pas été confirmée. Le véritable inconvénient est l'irréversibilité de fait. Certaines méthodes, entre les mains de certains praticiens, permettent la réversion, mais il est hors de question d'en faire une technique adaptable sur simple demande, compte tenu de sa difficulté et même du caractère aléatoire de la réversibilité : l'altération de l'épithélium séminifère pourrait être irréversible, même chez des hommes chez qui la continuité a été rétablie. Il y a naturellement une question de choix à respecter chez les demandeurs, mais personnellement le principe même de l'irréversibilité probable me semble très criticable, et je pense que ces techniques de stérilisation ne sont qu'un moment de l'histoire de la contraception qu'il faudra dépasser.

Les méthodes *s'opposant à la biosynthèse* des spermatozoïdes sont réversibles, et pour cela même, plus acceptables.

La plus simple et la plus singulière est (serait) d'élever la température testiculaire de quelques degrés (deux ou trois), représentant la différence physiologique entre la température des bourses et celle de l'intérieur de l'abdomen. On sait d'ailleurs que la persistance de cette élévation thermique, réalisée en cas de défaut de la descente testiculaire chez le petit enfant (*cryptorchie*), peut être responsable d'une modification irréversible de l'épithélium germinatif avec stérilité. Deux semaines suffisent pour altérer qualitativement et quantitativement la spermatogénèse, ce que l'on peut observer non seulement expérimentalement mais aussi au cours de maladies fébriles prolongées. La synthèse des androgènes et la virilité ne sont cependant pas modifiés.

Il est intéressant de noter que depuis plusieurs décennies, on enregistre une diminution significative du nombre des spermatozoïdes dans le sperme des hommes des pays de l'Europe de l'Ouest. On ne sait pas s'il y a retentissement sur la fécondité des hommes. On ne sait pas non plus la raison de cette diminution, que l'on recherche actuellement au niveau de l'environnement, y compris chimique et même hormonal (substances œstrogéniques), mais on n'a pas éliminé le port de vêtements plus serrés qu'auparavant.

1.2.3. Méthodes hormonales de contraception

Alors que la testostérone est active de façon paracrine sur la spermatogénèse, c'est à elle aussi que l'on s'adresse pour supprimer la spermatogénèse en utilisant un mécanisme hormonal classique de *retrocontrôle négatif*. En effet, la tes-

tostérone exerce un effet de « feed-back » sur la production du GnRH hypothalamique et celle de LH et de FSH par l'hypophyse. Son administration entraîne ainsi la baisse de la testostérone endogène, mais cette dernière est compensée par le produit injecté qui permet une fonction sexuelle normale. La dose adéquate de testostérone (ou d'un autre androgène actif) qu'il faut administrer (par voie orale, par injection d'un produit retard, ou en patch) est difficile à définir : il faut qu'elle soit suffisante pour bloquer la spermatogenèse et permettre l'activité sexuelle, mais il n'en faut pas trop afin de ne pas provoquer de désordres métaboliques, en particulier un excès de l'anabolisme des protéines et une augmentation des lipides sanguins. Une autre façon de régler cette difficulté consiste à dissocier le freinage désiré de la spermatogenèse de la compensation de la baisse de testostérone ; on administre un progestagène [tel que le DMPA (depo medroxy progesterone acetate)], qui bloque tout, et on donne un androgène de compensation, en plus, dont on peut régler la dose de façon indépendante. Dans tous les cas, compte tenu de l'effet de freinage au niveau des spermatogonies, il faudra attendre environ deux mois au moins pour constater la quasi disparition des spermatozoïdes puisque les vagues successives de cellules germinales ayant déjà commencé la séquence de développement continuent leur évolution. Le principe freinage-compensation est parfaitement acceptable du point de vue endocrinologique, mais il n'en reste pas moins difficile à mettre en application si l'on tient compte des risques à éviter lors d'une administration prolongée d'androgènes. Nous avons évoqué le rôle important de l'activine dans la régulation de FSH, et il n'est pas impossible qu'au futur des antagonistes puissent efficacement supprimer la spermatogenèse sans affecter la production hormonale endogène de testostérone.

1.2.4. Méthodes chimiques

L'importance des processus de multiplication cellulaire mitotiques et méiotiques au cours de la formation des spermatozoïdes a naturellement provoqué l'étude d'un certain nombre de molécules ayant montré une certaine efficacité dans le contrôle de cancers et leucémies expérimentaux. Des dérivés sulfoniques et des nitrofuranes ont en particulier été essayés chez l'animal, mais dans l'ensemble aucun n'a montré de spécificité suffisante pour que l'on puisse penser à les utiliser pour empêcher la spermatogenèse sans altérer la prolifération normale dans l'organisme d'autres cellules, par exemple au niveau du système digestif. Un espoir longtemps poursuivi a concerné le *gossypol*, présent dans l'huile de graine de coton. On savait que les paysans chinois récoltants présentaient souvent une azoospermie, et certains même une régression testiculaire importante. Le mécanisme d'action du *gossypol* et des centaines d'analogues qui ont été synthétisés reste mal connu, même si l'on sait qu'il implique une isoenzyme particulière de la lactico déshydrogénase. L'utilisation prolongée du composé peut entraîner des atrophies testiculaires irréversibles, et surtout le produit est spé-

cialement toxique au niveau des tubes rénaux, entraînant une baisse de la kaliémie. Il y a peu de chances qu'un produit efficace et sûr soit rapidement disponible.

La traversée de l'épididyme et les modifications qui activent les spermatozoïdes forment une cible potentielle de grand intérêt pour la contraception, puisque les délais à observer pour obtenir une inhibition comme pour sa réversion pourraient être beaucoup plus courts qu'au niveau de la spermatogenèse. Composé chimiquement assez simple, l' α -chlorydrine est très actif chez l'animal, mais malheureusement a des effets toxiques au niveau du système nerveux central qui en empêche l'utilisation chez l'homme. Toute une série de phosphates et sulfonates de méthyl est en cours d'étude.

Tout récemment, et pouvant constituer une approche du problème directement au niveau du spermatozoïde, le *RU486* a démontré des effets au niveau de la membrane des spermatozoïdes, en s'opposant à l'activité de la progestérone qui favorise l'entrée du calcium nécessaire au fonctionnement de la cellule germinale. La modification des mouvements des spermatozoïdes, l'altération de la réaction acrosomiale et la baisse du pouvoir de pénétration dans l'ovocyte de hamster (test de Yanagimashi mettant en présence spermatozoïdes humains et ovocytes de hamster) sont d'autant plus intéressants qu'on obtient des résultats du même type avec des dérivés sans activité hormonale (sans liaison aux récepteurs des hormones stéroïdes endogènes). Les problèmes qui restent à étudier concernent la spécificité de ce type d'action et son efficacité *in vivo*, sans compter naturellement l'analyse de la toxicité possible pour l'organisme en dehors du système reproducteur.

II. SÉMINAIRES AU COLLÈGE DE FRANCE

I.1. Protéines de choc thermique et chaperons moléculaires

— 5 octobre, P^r Carl WU, National Cancer Institute (NIH) « Chromatin structure and transcriptional regulation of heat shock genes ».

— 12 octobre, D^r Helen SAIBIL, Birbeck College, Londres, « Transformations of chaperonin complexes in assisted protein folding ».

— 26 octobre, P^r Bernd BUKAU, Zentrum für Molekulare Biologie, Heidelberg, « Molecular analysis of the DnaK chaperone system of *E. Coli* ».

— 2 novembre, D^r Philippe BOULOC, Institut Jacques Monod, Département de Microbiologie, « HfIB contrôle la dégradation de $\sigma 32$, le régulateur de la réponse au choc thermique d'*Escherichia Coli* ».

— 9 novembre, D^r Maria-Grazia CATELLI, INSERM U33 « Communications Hormonales », « Régulation, structure et fonction de la protéine de choc thermique Hsp90 ».

— 16 novembre, D^r Costa GEORGOPOULOS, Université de Genève, « Protein-protein association and reconstitution of interaction of heat shock/chaperone proteins ».

I.2. Données récentes sur la maîtrise de la reproduction humaine

— 23 novembre, P^r Georges DAVID : Université Paris-Sud, « La part de l'homme ».

— 30 novembre, P^r André VAN STERTEGHEM, Centre de Médecine de la Reproduction, Faculté de Médecine de l'Université Libre de Bruxelles, « Injection intracytoplasmique du spermatozoïde dans l'ovocyte pour le traitement de l'infertilité masculine ».

A plusieurs reprises, en particulier les 5 et 26 octobre et le 23 novembre, le cours et les séminaires correspondants ont été interrompus ou retardés par un groupe de perturbateurs manifestant à haute voix leur hostilité à l'utilisation de l'antiprogestérone RU486, dans le cadre de leur campagne contre l'IVG. Ils ont agressé verbalement le Professeur, ainsi que l'Administrateur et les Professeurs venus assister à ces leçons. On a remarqué la présence de plusieurs membres des forces de police, sans qu'ils interviennent ou contribuent à rétablir la liberté de l'enseignement. Le Professeur a présenté ses excuses au public et, tout particulièrement, aux scientifiques invités dont les séminaires ont été troublés.

III. COURS DU COLLÈGE DE FRANCE DISPENSÉS À L'EXTÉRIEUR

— Bordeaux, 9 mars 1995 : Etienne Baulieu a professé dans le cadre de l'Ecole doctorale Sciences biologiques et médicales des Universités Bordeaux I et II : « Maîtrise de la procréation : de la biologie des récepteurs à l'utilisation des anti-hormones » ;

— Toulouse, 23 mars 1995 : Dans le cadre de l'Université Paul Sabatier, Toulouse II, Etienne Baulieu a professé 2 cours :

- Mécanismes d'action des hormones stéroïdes.
- Des mécanismes d'action des hormones stéroïdes à la maîtrise de la reproduction humaine.

IV. ACTIVITÉS DE RECHERCHE

E.-E. Baulieu impulse et coordonne les recherches de plusieurs domaines, tous originellement en rapport avec la *production*, le *métabolisme* et les *effets physio-*

logiques, pathologiques et thérapeutiques des stéroïdes hormonaux. Essentiellement, il s'agit de l'étude analytique et fonctionnelle des *récepteurs* des cinq hormones stéroïdiennes, de celle des *protéines associées* aux récepteurs, en particulier la *protéine de choc thermique Hsp90* et de nouvelles *immunophilines*, et des *neurostéroïdes*. Portant sur des fonctions différentes, ces recherches relèvent de disciplines et méthodes communes, l'endocrinologie, la biologie cellulaire et moléculaire, l'immunologie et la neurobiologie en particulier. A ces recherches de type fondamental, se sont ajoutées récemment des *études cliniques* portant principalement sur les effets contraceptifs du *RU486*, molécule antiprogéstérone et antiglucocorticostéroïde, et des travaux sur la *déhydroépiandrostérone* (DHEA) et son sulfate (SDHEA), en rapport avec le vieillissement.

IV.1. Directions générales des recherches de laboratoire

Toutes les recherches concernent initialement les activités des hormones stéroïdes, principalement dans le domaine de la reproduction et des activités sexuelles (estradiol, progestérone, testostérone) et celles des corticostéroïdes qui régulent les grands métabolismes organiques, les phénomènes inflammatoires et immunologiques (glucocorticostéroïdes tel que le cortisol), et le métabolisme hydrominéral (minéralocorticostéroïdes comme l'aldostérone). Ce que l'on sait actuellement de plus important relève de la mise en évidence des récepteurs intracellulaires de ces hormones lipidiques qui pénètrent à l'intérieur des cellules cibles et y modulent l'expression des gènes. Nous continuons des expériences étudiant les modalités du fonctionnement de ces récepteurs, mais la découverte de protéines qui leur sont associées nous a amené à des travaux dérivant en partie des objectifs initiaux, en particulier avec les protéines de choc thermique et des immunophilines. De plus, à partir d'observations mettant en évidence la biosynthèse et le métabolisme de certains stéroïdes dans le système nerveux, tout un ensemble de recherches concerne le fonctionnement de ces « neurostéroïdes » et leur importance physiopathologique. Enfin, à la suite de travaux de recherche de laboratoire, nous sommes en mesure de piloter des essais cliniques impliquant des stéroïdes dans les domaines de la reproduction et du vieillissement.

Dans le domaine des *récepteurs*, les travaux ont analysé le rôle des différents domaines du récepteur des glucocorticostéroïdes dans sa dimérisation et dans son interaction avec l'ADN des « glucocorticosteroid response elements » (GREs). Les deux régions N et C-terminales contribuent de façon synergique au processus de dimérisation, et la région N-terminale significativement à l'augmentation de l'affinité du dimère pour l'ADN. En étudiant le gène de la tyrosine aminotransférase, régulé positivement par les glucocorticostéroïdes (et l'AMP cyclique, et négativement par l'insuline), on a pu établir un système de transcription tissu-spécifique. On a montré l'importance des éléments cis-GRE, et la possibilité d'obtenir dans ces conditions une réponse semblable, que le récepteur soit complexé à un agoniste ou à l'antagoniste RU486 (ce dernier résultat cor-

respond à des données physico-chimiques d'interaction récepteur-ADN, et des effets de l'antagoniste dans certaines circonstances cliniques). Des recherches ont également porté sur la spécificité tissulaire de l'activité du promoteur de la tyrosine aminotransférase dans les cellules hépatiques et les facteurs de transcription spécifique du foie. Afin de résoudre les questions posées cliniquement par la résistance à l'effet des hormones, y compris dans certaines tumeurs, les recherches ont analysé la modulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur des glucocorticostéroïdes selon les mutations.

Les recherches portant sur la *protéine de choc thermique Hsp90* font suite à la découverte, dans notre laboratoire, des complexes hétéroooligomériques des récepteurs d'hormones stéroïdes. Les travaux se sont situés à différents niveaux : avec le groupe de J.P. Mornon (Université Paris 7), des études structurales ont mis en évidence des analogies entre les familles Hsp60, Hsp70 et Hsp90 des protéines de choc thermique, suggérant l'application d'un mécanisme d'oxidoréduction dans leur activité chaperon. La découverte de l'isoforme β (Hsp90 β) chez le poulet et de l'absence de sa régulation par le choc thermique a permis de généraliser la présence systématique de deux protéines α et β qui ont divergé à l'apparition des vertébrés. L'étude comparée des promoteurs de ces protéines se poursuit en tenant compte de la régulation dépendante du cycle cellulaire et des réponses à certains facteurs de croissance mises en évidence antérieurement. La caractérisation des protéines impliquées dans la régulation des promoteurs est en cours, ainsi que les tests fonctionnels utilisant des mutants pour déterminer les séquences en cis qui sont en cause dans la régulation.

Une série d'observations a permis de mettre en évidence l'interaction Hsp90-récepteur des stéroïdes dans le contexte d'une activité cellulaire intacte. Des constructions à base d'Hsp90 α ont permis d'obtenir une protéine ciblée pour se localiser dans le noyau, et des anticorps spécifiques pour repérer l'Hsp90 hétérologue et le récepteur après transfection ont été utilisés pour observer leur localisation cellulaire par microscopie confocale. Le transfert des récepteurs par la Hsp90 ciblée dans le noyau a été observé ; le transfert de la Hsp90 normale par un récepteur naturellement nucléaire a été également démontré. De nouvelles observations ont aussi vérifié le concept de la dissociation du complexe Hsp90 récepteur par une hormone agoniste, tandis que certains antagonistes semblent influencer l'interaction Hsp90-récepteur de telle sorte que le complexe reste dans le cytoplasme au lieu de pouvoir interagir avec l'ADN dans le noyau. Enfin des expériences de mutagenèse de l'Hsp90 a permis de démontrer que la partie C-terminale de l'Hsp90 est nécessaire pour l'interaction avec le récepteur de la progestérone, et pour la dimérisation de l'Hsp90.

Plusieurs domaines de l'Hsp90 ont été étudiés, essentiellement par délétion (les résultats sont importants, mais ne peuvent démontrer directement la participation d'une région de la protéine à l'interaction protéine-protéine). Les outils moléculaires et cellulaires mis au point ont permis d'étudier également la parti-

cipation de la Hsp90 au trafic nucléocytoplasmique des récepteurs en l'absence d'hormone, et éventuellement en présence d'immunosuppresseurs qui se lient aux immunophilines FKBP59 et Cyp40, elles-même se liant à l'Hsp90. Ces travaux dépassent donc les frontières de l'endocrinologie moléculaire pour approcher certains mécanismes du fonctionnement cellulaire par les chaperons moléculaires, et des interconnexions entre différents systèmes de signalisation cellulaire.

Il en est de même avec les suites de l'observation de la liaison entre Hsp90 et une protéine (p59) qui, après clonage, s'est révélé être une *immunophiline*, liant l'immunosuppresseur FK506 et la rapamycine. On a pu montrer que l'interaction de cette nouvelle immunophiline avec la Hsp90 ne dépendait pas de l'ATP, et ne semblait être modulée ni par les immunosuppresseurs ni par le calcium. C'est par des essais directs d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante qu'on a démontré que les trois motifs répétitifs de 34 acides aminés TPR (tetra-tricopeptid repeat) localisés dans la partie C-terminale de la FKBP59 étaient impliqués de façon obligatoire dans les interactions protéine-protéine. De façon semblable, les TPRs de la cyclophiline 40 (Cyp40) sont responsables également d'une interaction stable de cette immunophiline avec Hsp90. Il s'agit d'observations d'intérêt dépassant le cadre hormonal, puisque les protéines avec TPR forment un ensemble de composés dont l'activité est impliquée dans les processus de division cellulaire et peut-être de la transcription des gènes en général.

La protéine (p59) associée à la Hsp90 est une nouvelle immunophiline, FKBP59, qui a été désignée comme HBI (Heat shock protein binding immunophilin). Cette immunophiline apparaît comme multifonctionnelle, en particulier parce qu'elle lie l'ATP et la GTP dans le deuxième domaine de type FKBP observé en N-terminal, qu'elle interagit avec la calmoduline en C-terminal, et que sa structure inclut un motif TPR (3 séquences de 34 acides aminés). Ces résultats ont indiqué l'existence de complexes incluant FKBP59, Hsp90 et récepteurs des glucocorticostéroïdes, de la progestérone et des œstrogènes. On a pu généraliser le modèle en indiquant que d'autres formules hétérologomériques contenaient une immunophiline Cyp40 à la place de FKBP59.

Dans ces conditions, il était logique d'essayer d'analyser les effets possibles sur le fonctionnement du récepteur des *immunosuppresseurs* FK506 et rapamycine qui se lient à la FKBP59, et cyclosporine A qui se lie à la Cyp40. Les résultats ont indiqué une absence de dissociation des complexes sous l'effet des immunosuppresseurs, indiquant que le site peptidylprolyl isomérase n'était pas impliqué pour la formation du complexe immunophiline-Hsp90. Une augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand a été mise en évidence, modeste mais reproductible. Reproductible aussi, mais très importante quantitativement, la potentialisation de l'activité de transcription du récepteur stimulé par l'hormone correspondante dans certaines cellules. Il n'a pas été possible de démontrer qu'il s'agissait d'un effet direct de transmission de l'information à travers le triplé des

protéines immunophilines-protéine de choc thermique-récepteur, mais l'importance du phénomène qui ne se retrouve qu'au niveau de certaines cellules, et peut être inverse (inhibition par les immunosuppresseurs de la réponse aux stéroïdes) serait de grande importance pratique pour l'utilisation des molécules immunosuppresseurs et stéroïdiennes. Des recherches, menées principalement avec des fibroblastes L269 de souris, des cellules embryonnaires de singe et des cellules humaines de cancer du sein ont montré la grande complexité de ces interactions entre différents systèmes de signalisation, et l'importance évidente mais encore mal comprise de ces protéines d'intervention que sont les protéines de choc thermique et les immunophilines qui sont maintenant reclassées sous le nom de *chaperons moléculaires*.

Après les observations initiales de la présence, de la synthèse et de l'action de plusieurs stéroïdes dans le système nerveux (*neurostéroïdes*), les recherches sont principalement orientées vers deux types d'activité, que l'on peut distinguer en modifications du fonctionnement nerveux et effets trophiques sur le système nerveux.

L'étude de l'effet des neurostéroïdes sur le fonctionnement de différents *récepteurs A du GABA*, transfectés à partir du cDNA des sous-unité correspondantes, a été poursuivie. Des effets sur le comportement d'agressivité, tel que celui décrit par le D^r Haug (Strasbourg) chez la souris, ont été étudiés corrélativement aux variations des neurostéroïdes spontanés ou induites par des modificateurs enzymatiques de la synthèse stéroïdienne. En collaboration avec les D^{rs} H. Simon, M. Le Moal et W. Mayo de Bordeaux, des corrélations entre fonction de *mémoire* et stéroïdes chez les rats âgés ont été rapportés. On a étudié la *libération de GnRH*, peptide d'origine hypothalamique qui stimule la production des hormones sexuelles hypophysaires à partir de neurones spécialisés : un métabolite de la progestérone peut stimuler cette libération, comme le montre une étude sur des neurones hypothalamiques immortalisés. Enfin une série d'études a mis en évidence l'effet des neurostéroïdes sur la *fonction sigma*, à l'aide d'un test de libération de la norépinéphrine induite par le N-méthyl-D-aspartate au niveau de coupes d'hippocampe de rat. L'importance du phénomène, la spécificité en fonction de la structure des stéroïdes en font un nouveau système de régulation au niveau duquel peuvent s'exprimer les stéroïdes synthétisés et métabolisés dans le cerveau. Compte tenu des corrélats pharmacologiques de l'activité des récepteurs sigma, ces observations pourraient avoir une réelle importance physiopathologique dans certains syndromes psychiatriques.

En ce qui concerne les actions trophiques des neurostéroïdes, l'observation la plus importante a porté sur la *réparation de la myéline* après cryo-lésion du nerf sciatique chez le rat et la souris. Essentiellement, les travaux ont démontré chez l'animal (et chez l'homme) la présence de quantité importante de prégnénolone dans le système nerveux périphérique. La transformation de prégnénolone en progestérone s'est révélée critique pour la réparation de la myéline au cours de

la réparation nerveuse, et les résultats de l'intervention de la *progestérone* ont été observés in vivo et in vitro. Cet effet que l'on peut définir comme une activité auto- et/ou paracrine des cellules de Schwann pourrait avoir des conséquences thérapeutiques importantes. D'autre part, les observations préliminaires suggèrent la possibilité que le même type d'effet de neuroprogestérone soit fonctionnel pour la myélinisation que provoquent les oligodendrocytes dans le système nerveux central. Il s'agit donc d'une nouvelle voie de recherche dont les débouchés théoriques et pratiques dans le cadre des affections neurodégénératives motivent la poursuite.

Au cours de travaux systématiques, en utilisant les méthodes de détection immunologique et par hybridation moléculaire de l'ARN des enzymes de la stéroïdogénèse, on a été amené à observer la très curieuse présence de l'enzyme (*17-hydroxylase*) impliquée dans la synthèse des androgènes au niveau des cellules pariétales de la muqueuse *gastrique* chez le rat. Cette découverte inopinée reste actuellement sans signification physiologique connue.

IV.2. Etudes cliniques

Les études sur le *RU486* sont poursuivies à un rythme très insuffisant, du fait du blocage de la distribution du composé par la firme Hoechst-Roussel. Cependant, une étude polycentrique de *contraception*, utilisant l'effet de *RU486* à très faible dose au niveau endométrial en l'absence de changements hormonaux et avec conservation de l'ovulation, est en cours d'implantation à Paris, dans des services de reproduction et d'endocrinologie des hôpitaux, à Stockholm, Norfolk, Los Angeles et Santiago. La première étape consiste à définir la dose maximale quotidienne (fraction de milligramme) qui ne provoque aucune modification endocrinienne ou de l'ovulation chez la femme. Les effets sur l'endomètre, la fécondation et la poursuite de la grossesse seront ensuite étudiés. Il s'agirait alors d'une toute nouvelle méthode de contraception de grand intérêt médical.

D'autre part et enfin, les observations des taux de *DHEA* (déhydroépiandrostérone) sulfate (*DHEAS*) chez des sujets âgés et adultes jeunes ont indiqué l'intérêt de cette détermination, dans la mesure où la concentration semble largement déterminée génétiquement. Des résultats préliminaires d'administration de *DHEA* à des sujets vieillissants confirment l'effet de « bien être » induit par de faibles doses réparatrices de la décroissance physiologique de sa concentration avec l'âge, avec augmentation du taux circulant d'*IGF1* (insulin like growth factor 1). La mise au point d'un protocole et l'implantation d'un essai d'administration de *DHEA* dans les hôpitaux de Paris, centralisé au niveau de la Fondation Nationale de Gérontologie, est en cours.

V. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**V.1. Publications scientifiques par Etienne Baulieu et collaborateurs**

KANG K.I., DEVIN J., CADEPOND F., JIBARD N., GUIOCHON-MANTEL A., BAULIEU E.E. et CATELLI M.G. *In vivo* functional protein-protein interaction : nuclear targeted Hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **91**, 340-344, 1994.

YANG J., SERRES C., PHILIBERT D., ROBEL P., BAULIEU E.E. ET JOUANNET P. Progesterone and RU486 : opposing effects on human sperm. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **91**, 529-533, 1994.

JUNG-TESTAS I., SCHUMACHER M., ROBEL P. et BAULIEU E.E. Action of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **48**, 145-154, 1994.

RENOIR J.M., LE BIHAN S., MERCIER-BODARD C., GOLD A., ARJOMANDI M., RADANYI C. et BAULIEU E.E. Effects of immunosuppressants FK506 and rapamycin on the heterooligomeric form of the progesterone receptor. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **48**, 101-110, 1994.

CALLEBAUT I., CATELLI M.G., PORTETELLE D., BURNY A., BAULIEU E.E. et MORNON J.P. Structural similarities between chaperone molecules of the Hsp60 and Hsp70 families deduced from hydrophobic cluster analysis. FEBS Letters, **342**, 242-248, 1994.

CADEPOND F., JIBARD N., BINART N., SCHWEIZER-GROYER, SEGARD-MAUREL I. et BAULIEU E.E. Selective deletions in the 90 kDa heat shock protein (Hsp90) impede hetero-oligomeric complex formation with the glucocorticosteroid receptor (GR) or hormone binding by GR. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, **48**, 361-367, 1994.

YOUNG J., CORPECHOT C., PERCHE M., HAUG M., BAULIEU E.E. et ROBEL P. Neurosteroids : pharmacological effects of a 3β -hydroxy-steroid dehydrogenase inhibitor. Endocrine, **2**, 505-509, 1994.

SCHWEIZER-GROYER G., GROUYER A., CADEPOND F., GRANGE T., BAULIEU E.E. et PICTET R. Expression from the tyrosine aminotransferase promoter (nt - 350 to + 1) is liver-specific and dependent on the binding of both liver-enriched and ubiquitous *trans*-acting factors. Nucleic Acids Research, **22**, 1583-1592, 1994.

CALLEBAUT I., CATELLI M.G., PORTETELLE D., MENG X., CADEPOND F., BURNY A., BAULIEU E.E. et MORNON J.P. Redox mechanism for the chaperone activity of heat shock proteins Hsps60, 70 and 90 as suggested by hydrophobic

cluster analysis : hypothesis. Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris, **317**, 721-729, 1994.

LOMBES M., BINART N., DELAHAYE F., BAULIEU E.E. et RAFESTIN-OBLIN M.E. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. Biochemical Journal, **302**, 191-197, 1994.

LEBEAU M.C., MYAGKIKH I, ROUVIERE-FOURMY N., BAULIEU E.E. et KLEE C.B. Rabbit FKBP-59/HBI does not inhibit calcineurin activity *in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **203**, 750-755, 1994.

RADANYI C., CHAMBRAUD B. et BAULIEU E.E. The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90 kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **91**, 11197-11201, 1994.

THOMAS G., FRENOY N., LEGRAIN S., SEBAG-LANOE R., BAULIEU E.E. et DEBUIRE B. Serum dehydroepiandrosterone sulfate levels as an individual marker. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, **79**, 1273-1276, 1994.

MENG X., BAULIEU E.E. et CATELLI M.G. Isolation of chicken Hsp90 β gene promoter. Biochemical and Biophysical Research Communications, **206**, 644-651, 1995.

ZHANG J., AKWA Y., BAULIEU E.E. et SJOVALL J. 7 α -hydroxylation of 27-hydroxycholesterol in rat brain microsomes. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, **318**, 345-349, 1995.

PERROT-APPLANAT M., CIBERT C., GERAUD G., RENOIR J.M. et BAULIEU E.E. The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. Journal of Cell Science, **108**, 2037-2051, 1995.

EL-ETR M., AKWA Y., FIDDES R.J., ROBEL P. et BAULIEU E.E. A progesterone metabolite stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone from GT1-1 hypothalamic neurons via the γ -aminobutyric acid type A receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **92**, 3769-3773, 1995.

LE GOASCOGNE C., SANANES N., EYCHENNE B., GOUEZOU M., BAULIEU E.E. et ROBEL P. Androgen biosynthesis in the stomach : expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. Endocrinology, **136**, 1744-1752, 1995.

HAUSER C.A.E., CHESNOY-MARCAIS D., ROBEL P. et BAULIEU E.E. Modulation of recombinant $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ GABA $_A$ receptors by neuroactive steroids. European Journal of Pharmacology, **289**, 249-257, 1995.

MONNET F.P., MAHIE V., ROBEL P. et BAULIEU E.E. Neurosteroids via σ receptors, modulate the [3 H]norepinephrine release evoked by *N*-methyl-D-aspartate

in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**, 3774-3778, 1995.

KOENIG H.L., SCHUMACHER M., FERZAZ B., DO THI A.N., RESSOUCHES A., GUENNOUN R., JUNG-TESTAS I., ROBEL P., AKWA Y. et BAULIEU E.E. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, **268**, 1500-1503, 1995.

RENOIR J.M., MERCIER-BODARD C., HOFFMANN K., LE BIHAN S., NING Y.M., SANCHEZ E.R., HANDSCHUMACHER R.E. et BAULIEU E.E. Cyclosporin A potentiates the dexamethasone-induced mouse mammary tumor virus-chloramphenicol acetyltransferase activity in LMCAT cells : A possible role for different heat shock protein-binding immunophilins in glucocorticosteroid receptor-mediated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**, 4977-4981, 1995.

GUENNOUN R., FIDDES R.J., GOUEZOU M., LOMBES M. et BAULIEU E.E. A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase (3 β -HSD), is expressed in rat brain. *Molecular Brain Research*, **30**, 287-300, 1995.

V.2. Articles de revue par Etienne Baulieu et collaborateurs

ROBEL P. et BAULIEU E.E. Steroid hormone receptors involved in reproduction : mechanism of action. In « Control of Uterine Contractility » (R.E. Garfield, et T.N. Tabb, eds), pp. 229-253, 1994, CRC, London.

BAULIEU E.E. Mechanism of action of steroid hormones and antihormones : a mini-overview. In « Basic Mechanisms Controlling Term and Preterm Birth » (K. Chwalisz et R.E. Garfield, eds), pp. 89-95, 1994, Springer-Verlag, Berlin.

ROBEL P. et BAULIEU E.E. Neurosteroids. Biosynthesis and function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **5**, 1-8, 1994.

LEBEAU MC et BAULIEU E.E. Steroid antagonists and receptor-associated proteins. *Human Reproduction*, **9**, 437-444, 1994.

BAULIEU E.E. Les sciences de la reproduction aujourd'hui. In « Où va la population mondiale ? » (Les éditions du Quotidien du Médecin), pp. 43-54, 1994.

BAULIEU E.E. RU486 : a compound that gets itself talked about. *Human Reproduction*, **9** suppl. 1, 1-6, 1994.

BAULIEU E.E. Réflexion sur le contrôle des naissances (sur la Conférence du Caire). *Le Figaro*, Mardi 13 Septembre 1994.

BAULIEU E.E. The presentation of RU486 in the media. In « The Role of the Media in Science Communication ». *Proceedings of the Ciba Foundation Discussion Meeting, Stockholm - Suède, 7-8 décembre 1993* (K. Ackrill, ed), pp. 141-154, 1994.

ROBEL P. et BAULIEU E.E. Neurosteroids : biosynthesis and function. In « Methods in Neurosciences » (E.R. de Kloet, W. Sutando, eds), pp. 36-50, vol. 22, 1994, Academic Press, Orlando.

BAULIEU E.E. RU486 : After ten years. Novel molecules and reproductive medicine. In « Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions ». Reproductive Biology. Proceedings of the Ninth International Congress of Endocrinology, Bordeaux, 6-10 septembre, 1992. (S.R. Glasser, J. Mulholland, A. Psychoyos, eds), pp. 137-161, 1994, Plenum Press, New York.

MESTER J. et BAULIEU E.E. Nuclear receptor superfamily. In « Endocrinology ». (De Groot L.J., ed), vol. 1, 3^e édition, pp. 93-118, 1995, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

PEYRON R., ULMANN A. et BAULIEU E.E. La mifépristone (RU486) : actualités, perspectives. *La Presse Médicale*, **24**, 295-298, 1995.

BAULIEU E.E. Studies on dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate during aging. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris*, **318**, 7-11, 1995.

BAULIEU E.E. The combined use of prostaglandin and antiprogestin in human fertility control. In « Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research ». Proceedings of the Ninth International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence, Italy. (B. Samuelsson, P.W. Ramwell, R. Paoletti, G. Folco, E. Granström, S. Nicosia, eds), pp. 55-62, vol. 23, 1995, Raven Press, New York.

V.3. Travaux scientifiques publiés par des collaborateurs du laboratoire

YOUNG J., COUZINET B., PHOLSENA M., NAHOUL K., LABRIE F. et SCHAISON G. Plasma 3 β -hydroxy- Δ 5-steroids in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **78**, 299-304, 1994.

SAVOURET J.F., RAUCH M., REDEUILH G., SAR S., CHAUCHEREAU A., WOODRUFF K., PARKER M.G. et MILGROM E. Interplay between estrogens, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 28955-28962, 1994.

LOMAX R.B., MCNICHOLAS C.M., LOMBES M. et SANDLE G.I. Aldosterone-induced apical Na⁺ and K⁺ conductances are located predominantly in surface cells in rat distal colon. *The American Physiological Society*, **266**, G71-G82, 1994.

KENOUGH S., LOMBES M., DELAHAYE F., EUGENE E., BONVALET J.P. et FARMAN N. Human skin as target for aldosterone : coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **79**, 1334-1341, 1994.

V.4. Articles de revue publiés par des collaborateurs du laboratoire

ROBEL P., SOUFIR J.C. et BOYER P. Procréation : approche physiologique. In « Transmettre la vie à l'aube du XXI^e siècle » pp. 17-30, INSERM/Nathan, Paris.

ROBEL P., SOUFIR J.C. et BELLET D. La contraception hormonale. In « Transmettre la vie à l'aube du XXI^e siècle » pp. 31-45, 1994, INSERM/Nathan, Paris.

GRAVANIS A., MARGIORIS A. et ROBEL P. Récepteurs hormonaux, facteurs de croissance et endomètre. *Reproduction humaine et Hormones*, VII, 285-289.

ROBEL P. Prostate-specific antigen : present and future. In « Contributions to Oncology ». (M. Bolla, J.J. Rambeaud, F. Vincent, eds), pp. 46-56, vol. 47, 1994, Karger, Basel.

SOUFIR J.C. et ROBEL P. Prostate, organe cible des androgènes. Sécrétions prostatiques et procréation. In « La Voie Séminal et ses Glandes. Leur Rôle dans l'Infertilité ». (J.P. Dadoune, A. Clavert, G. Arvis coordinateurs), pp. 51-70, 1994, Doin, Paris.

V.5. Communications à des congrès scientifiques par Etienne Baulieu et collaborateurs

Communication présentée au « 76th Annual Meeting of the Endocrine Society ». Anaheim, CA, 15-18 juin 1994.

LE GOASCOGNE C., EYCHENNE B., SANANES N., GOUZOU M., BAULIEU E.E. et ROBEL P. Androgen biosynthesis by the parietal cells of the rat gastric mucosa, p. 253, abstract n° 210.

Communication présentée au « 1994 Meeting on Biology of Heat Shock Proteins & Molecular Chaperones ». Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 4-8 mai 1994.

KANG K.I., DEVIN J., MENG X., CADEPOND F., BAULIEU E.E. et CATELLI M.G. *In vivo* interactions between steroid receptors and Hsp90 : implications for steroid hormones action, p. 218.

Communication présentée au « 23rd Annual Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology ». Tamarron, USA, 13-20 février 1994. *J. Cell. Biochem.*, suppl. 18C.

CATELLI M.G., KANG K.I., DEVIN J., CADEPOND F., JIBARD N., GUIOCHON-MANTEL A. et BAULIEU E.E. *In vivo* functional protein-protein interaction : nuclear targeted Hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. Abstract n° M101, p. 88.

Communication présentée à l'« European Science Foundation ». Micromolecules and the Stress Response. Rome, Italie, 12-14 juin 1994.

KANG K.I., MENG X., DEVIN J., CADEPOND F., BAULIEU E.E. et CATELLI M.G. *In vivo* steroid receptors-Hsp90 interaction : implications for steroid hormones action, p. 25.

Communication présentée au « 10th Biennial Meeting for Developmental Neuroscience ». San Diego, Californie, 30 juillet-3 août, 1994.

BAULIEU E.E., SCHUMACHER M., KOENIG H., JUNG-TESTAS I. et AKWA Y. Neurosteroids : action within the nervous system, p. 53, abstract n° 28.

Communications présentées à la « XVII^e Réunion du Groupe Développement ». Développement du système nerveux. Paris, 17-18 mai 1994.

SCHUMACHER M., FERZAZ B., DO THI N.A., AKWA Y., RESSOUCHES A., JUNG-TESTAS I., ROBEL P., BAULIEU E.E. et KOENIG H. Les cellules de Schwann synthétisent des neurostéroïdes qui interviennent dans le processus de myélinisation. Etude *in vivo* et *in vitro*, p. 11, communication orale n° 11.

JUNG-TESTAS I., SCHUMACHER M., ROBEL P. et BAULIEU E.E. La progestérogène, une hormone stéroïde, augmente la synthèse de protéines de la myéline dans les oligodendrocytes, p. 32, poster n° 28.

Communications présentées au « First European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease ». Heidelberg, 24-27 mars 1994.

JUNG-TESTAS I., SCHUMACHER M., ROBEL P. et BAULIEU E.E. Progesterone, a sex steroid hormone, increases the expression of MBP and CNPase in rat oligodendrocytes in primary culture, p. 109.

KOENIG H.L., FERZAZ B., AKWA Y., DO THI N.A., JUNG-TESTAS I., RESSOUCHES A., BAULIEU E.E. et SCHUMACHER M. Neurosteroids : pregnenolone and progesterone promote myelination in regenerating peripheral nerve, p. 116.

SCHUMACHER M., DO-THI N.A., AKWA Y., FIDDES R., JUNG-TESTAS I., FERZAZ B., ROBEL P., BAULIEU E.E. et KOENIG H. Progesterone : an autocrine factor within the peripheral nervous system, p. 168.

Communication présentée au « 3rd International Congress of Neuroendocrinology ». Budapest, Hongrie, 3-8 juillet 1994. Neuroendocrinology, vol. 60, suppl. 1.

EL-ETR M., AKWA Y., FIDDES R.J., ROBEL P. et BAULIEU E.E. Neurosteroids modulate the release of GnRH from GT1-1 immortalized hypothalamic neurons, p. 51, abstract n° P2.38.

Communications présentées à la « 4^e Journée de la Recherche de la Faculté de Médecine Paris-Sud ». Le Kremlin-Bicêtre, 7 décembre 1994.

EL-ETR M., AKWA Y., FIDDES R., ROBEL P. et BAULIEU E.E. La 3 α -5 α -tétrahydroprogestérogène stimule la libération de GnRH (gonadotropin releasing hormone) par des neurones hypothalamiques immortalisés.

GUENOUN R., FIDDES R., GOUZOU M., LOMBES M., SHAZAND K., SCHUMACHER M. et BAULIEU E.E. Neurostéroïdes : caractérisation de l'isoforme cérébrale de la 3 β -hydroxystéroïde deshydrogénase / Δ^5 - Δ^4 isomérase (3 β -HSD).

Communication présentée au « 1^{er} Congrès des Chercheurs et Universitaires maghrébins ». Hammamet, 16-18 novembre 1994.

GUENNOUN R., FIDDES R., GOUEZOU M., LOMBES M., SHAZAND K., SCHUMACHER M. et BAULIEU E.E. Neurostéroïdes : caractérisation de l'isoforme cérébrale de la 3 β -hydroxystéroïde deshydrogénase / Δ^5 - Δ^4 isomérase (3 β -HSD), p. 68.

Communications présentées au « IX International Congress on Hormonal Steroids ». Dallas, 24-29 septembre 1994.

MERCIER-BODARD C. et BAULIEU E.E. Human sex steroid binding plasma protein (SBP) transcription in brain and target organs for steroid hormones. Abstract n° B179.

RENOIR J.M., MERCIER-BODARD C., LE BIHAN S. et BAULIEU E.E. Cyclosporin A, FK506 and Rapamycin, potentiate the glucocorticosteroid-induced MMTV-CAT transcriptional activity in LMCAT cells. A role for Heat shock protein Binding Immunophilins (HBIs) ? Abstract n° D109.

ROBEL P., YOUNG J., CORPECHOT C., MAYO W., PERCHE F., HAUG M., SIMON H. et BAULIEU E.E. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice : functional correlates. Abstract n° S172.

Communication présentée à la « 13^e réunion du Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives ». Nice, 15-16 décembre 1994.

LE GOASCOGNE C., SANANES N., EYCHENNE B., GOUEZOU M., BAULIEU E.E. et ROBEL P. Stéroïdogénèse gastrique : synthèse d'androgènes par les cellules pariétales.

Communication présentée aux « Rendez-vous de l'ARSEP ». Palais des Congrès de Paris, 30 novembre 1994.

JUNG-TESTAS I., SCHUMACHER M., ROBEL P. et BAULIEU E.E. La progestérogène, une hormone stéroïde, augmente la synthèse de protéines de la myéline dans les oligodendrocytes, p. 29.

Communications présentées à l'« International Workshop on What Steroid Hormones Tell the Brain ». Puerto de la Cruz, Santa Cruz de Tenerife, Espagne, 14-17 décembre 1994.

BAULIEU E.E., SCHUMACHER M., KOENIG H., JUNG-TESTAS I. et AKWA Y. Neurosteroids : action within the nervous system, p. 15.

JUNG-TESTAS I., ROBEL P., SCHUMACHER M. et BAULIEU E.E. The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin protein (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture, p. 53.

Communications présentées au « 77th Annual Meeting of the Endocrine Society ». Washington, DC, 14-17 juin 1995.

YOUNG J., CORPECHOT C., COUZINET B., BAULIEU E.E., ROBEL P. et SCHAISON G. The neuroactive steroid allopregnanolone contributes to the hypnotic effect of progesterone, p. 317, abstract n° P2-108.

CADEPOND F., JIBARD N., SCHWEIZER-GROYER G., SEGARD-MAUREL I. et BAULIEU E.E. Transcriptional properties of mutated glucocorticosteroid receptor (GR) derivatives coexpressed with wild-type GR, p. 415, abstract n° P2-499.

JUNG-TESTAS I., LEBEAU M.C., CATELLI M.G. et BAULIEU E.E. Cyclosporin A promotes nuclear transfer of a NLS minus progesterone receptor mutant, p. 422, abstract n° P2-427.

YOUNG J., CORPECHOT C., EYCHENNE B., BAULIEU E.E. et ROBEL P. Pharmacological manipulation of TH DOC levels in rodent brain, p. 604, abstract n° P3-543.

V.6. Communications à des congrès scientifiques par des collaborateurs du laboratoire

Communication présentée au « 76th Annual Meeting of the Endocrine society ». Anaheim, CA, 15-18 juin 1994.

YOUNG J., CHANSON P. et SCHAISON G. Octreotide inhibits basal but not TRH induced TSH and α -subunit secretion in severe primary hypothyroidism, p. 354, abstract n° 616C.

Communication présentée au « 1994 Meeting on Biology of Heat Shock Proteins & Molecular Chaperones ». Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 4-8 mai 1994.

MENG X., DEVIN J. et CATELLI M.G. *In vivo* interactions between Hsp90 and estrogen receptor. Hsp90 mutants : expression, biochemical properties, subcellular localisation and interactions, p. 187.

Communication présentée au « 24th Annual Meeting ». Society for Neuroscience, vol. 20, part 1, Miami Beach, Floride, 13-18 novembre 1994.

VALLÉE M., CORPECHOT C., MAYO W., ROBEL P., DELLU F., LE MOAL M. et SIMON H. Cognitive performance in aged rats is linked with the concentration of pregnenolone sulfate in the hippocampus, p. 389 abstract n° 166.6.

Communication présentée au « 14th Joint Meeting of the British Endocrine Societies ». Warwick, 27-30 mars 1995. J. Endocrinol., suppl. 144.

COLLINS B.E., CORPECHOT C., CAREY M.P., TSOUROU A., ROBEL P. et FRY J.P. Brain progesterone metabolism during the mouse estrus cycle. Abstract n° P277.

Communications présentées au « 77th Annual Meeting of the Endocrine Society ». Washington, DC, 14-17 juin 1995.

CHANSON P., PANTEL J., YOUNG J., BIDART J.M. et SCHAISON G. Plasma hLH β subunit in patients with pituitary adenoma, p. 121, abstract n° P1-36.

MAKRIGIANNAKIS A., MARGIORIS A., ZOUMAKIS E., LE GOASCOGNE C., NIKAS G., STOURNARAS C., PSYCHOYOS A. et GRAVANIS A. The corticotropin-releasing hormone (CRH) gene is expressed in the implantation sites of the early pregnant rat uterus, p. 131, abstract n° P1-74.

COUZINET B., YOUNG J., CHANSON P., BRAILLY S., THOMAS J.L. et SCHAISON G. The androgen receptor does not mediate the antigonadotropic activity of the progestin, nomegestrol acetate in women, p. 559, abstract n° P3-364.

VI. THÈSES DE DOCTORAT DES SCIENCES SOUTENUES EN 1994-1995

— Juin 1994 : **Valérie Jérôme**, « Régulation de la Hsp90 α de poulet par des agents mitogènes et au cours du cycle cellulaire », Université Paris XI.

— Juillet 1994 : **Véronique Marsaud**, « Etude des remaniements de la structure chromatinienne du promoteur du MMTV lors de son activation par les glucocorticoïdes », Université Paris XI.

— Avril 1995 : **Sophie Le Ricousse**, « Etude de la régulation du promoteur du virus de la tumeur mammaire de la souris par les glucocorticoïdes et les progestagènes (rôle des facteurs se liant sur le promoteur : rôle de la structure de la chromatine) », Université Paris XI.

— Juin 1995 : **Kang Kwang-il**, « Interaction fonctionnelle entre la Hsp90 et les récepteurs des hormones stéroïdes », Université Paris VI.

— Juillet 1995 : **Ingrid Maurel**, « Interactions moléculaires impliquées dans le fonctionnement du récepteur humain des glucocorticostéroïdes », Université Paris VI.

VII. CONFÉRENCES ET PARTICIPATIONS À DES RÉUNIONS SCIENTIFIQUES

Etienne Baulieu a participé à :

— Micromolecules and the stress response, Rome, juin 1994.

— Women's Health Research Institute : the contraceptive strategy technical assessment meeting, Philadelphie, juillet 1995.

- Second international symposium on hormonal carcinogenesis, Stockholm, juillet 1994.
- XII^e Congrès International de pharmacologie, Montréal, juillet 1994.
- 10th biennial meeting of the International Society for developmental neuroscience, San Diego, août 1994.
- CIBA Foundation Symposium n° 191, Londres (Non reproductive action of sex steroids), septembre 1994 (Chairman).
- Steroid receptors and antihormones, Dallas, septembre 1994.
- Journées « Nature » au Collège de France, octobre 1994.
- Congress : What steroid hormones tell the brain, Santa Cruz de Tenerife, décembre 1994.
- Réunion annuelle de la Société d'Obstétrique et de Gynécologie de l'Inde, Coimbatore, décembre 1995.
- Réunion de la Czech Family Planning Association, Prague, janvier 1995.
- Symposium Organon sur la contraception, Paris, janvier 1995.
- Enseignement d'éthique médicale, Faculté de médecine de Marseille, février 1995.
- 1995 Annual meeting : Society of gynecologic endocrinology, San Francisco, février 1995.
- Rencontre d'endocrinologie, Paris, mars 1995.
- VII^e réunion du Groupe d'Etude et de Recherche sur les Stéroïdes, Paris, mars 1995.
- 10^e Congrès de l'Association européenne des gynécologues et obstétriciens, Monaco, mars 1995.
- X^e Séminaire niçois de Médecine et biologie de la reproduction, Nice, avril 1995.
- Colloque INSERM sur la repousse axonale dans la moelle épinière et le nerf périphérique des mammifères, Deauville, avril 1995.
- Contribution de la biologie moléculaire à la découverte de médicaments, Euroconférences - (co-organisateur), Institut Pasteur, Paris, avril 1995.
- 10th Rinshoken international conference sur les protéines de choc thermique, Tokyo, mai 1995.
- 11th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Hambourg, juin 1995.
- Parkes Lecture of the Society for the Study of Fertility, Dublin, juillet 1995.
- 11th IFCC European congress of Clinical chemistry, Tampere, juillet 1995.

Participation des membres du laboratoire :

D^r Maria-Grazia Catelli

— 1995 Cold Spring Harbor Laboratory Symposium : Protein kinesis - The dynamics of protein trafficking and stability, Cold Spring Harbor, juin 1995.

— 10th Rinshoken international conference sur les protéines de choc thermique, Tokyo, mai 1995.

D^r Martine El Etr

— 33rd International Congress on neuroendocrinology, Budapest, juillet 1994.

D^r Ingrid Jung-Testas

— What steroid hormones tell the brain, Santa Cruz de Tenerife, décembre 1994.

— 12th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Berlin, mai 1995.

Stéphane Le Bihan

— 12th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Berlin, mai 1995.

D^r Marie-Claire Lebeau

— 1995 Cold Spring Harbor Laboratory Symposium : Protein kinesis - The dynamics of protein trafficking and stability, Cold Spring Harbor, juin 1995.

D^r Christine Mercier-Bodard

— IXth International Congress on hormonal steroids, Dallas, juillet 1994.

— 12th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Berlin, mai 1995.

D^r J.M. Renoir

— EMBO Workshop on Steroid Receptors, Porto Conte, avril 1995.

D^r Paul Robel

— CIBA Foundation symposium n° 191 (Non reproductive effects of sex steroids hormones), Londres, septembre 1994.

— 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, mai 1995.

D^r Nathalie Rouvière-Fourmy

— EMBO course on Multidimensional NMR in Structural Biology, Turin, août 1995.

D^r Michael Schumacher

— CIBA Foundation symposium n° 191 (Non reproductive effects of sex steroids hormones), Londres, septembre 1994.

— Colloque INSERM sur la repousse axonale dans la moelle épinière et le nerf périphérique des mammifères, Deauville, avril 1995.

D^r Jacques Young

— 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, mai 1995.

— Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging (New York Academy of Sciences), Washington, juin 1995.

VII. DISTINCTIONS

Etienne Baulieu a été nommé :

— Docteur *Honoris Causa* de l'Institut Karolinska de Stockholm, mai 1994.

— Docteur *Honoris Causa* de la Worcester Foundation, novembre 1994.

Il a reçu le Grand Prix de la Fondation pour la Recherche Médicale, avril 1995.

Christine Radanyi a reçu le Prix Max-Fernand Jayle 1995 de l'Académie des Sciences.

VIII. ACTIVITÉS DIVERSES

Etienne Baulieu préside le Conseil Scientifique de l'Association Equilibre et Populations. Il est membre du Conseil Scientifique de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP). Paul Robel (Directeur de Recherche au CNRS) préside l'ARTP et est membre du Conseil de la Faculté de Médecine Paris-Sud.