

## Physiologie du développement

M. Alfred JOST, professeur

Le cours de cette année a porté sur les mécanismes régulant la méiose. Il est inutile de rappeler ici l'importance de la méiose dans la biologie de l'espèce.

Si l'on envisage une cellule germinale, elle peut soit entrer en mitose soit amorcer le processus méiotique. Au cours de ce dernier, il n'y aura qu'une seule phase S pour deux divisions successives et les cinétochores subissent une duplication tardive. Il est cependant encore bien difficile de préciser sur quel mécanisme responsable de la division cellulaire agissent les facteurs qui détermineront si celle-ci sera mitotique ou méiotique.

En règle générale et à l'exception de certaines formes animales simples, la méiose survient seulement dans les cellules de la lignée germinale et non dans les cellules somatiques, même si celles-ci sont soumises au même environnement. Qu'ont donc de particulier les cellules germinales ? On peut envisager toute une série de caractéristiques, telles que le « déterminant germinale » mis en évidence sous une forme ou sous une autre dans les cellules de la lignée germinale de beaucoup d'espèces animales, ou bien l'activation précoce des deux chromosomes X dans le sexe féminin, ou encore la sensibilité particulière de ces cellules à certains composés chimiques ou à certaines radiations. Il ne semble pas que l'examen de ces divers facteurs ait pu permettre d'apporter une réponse claire à la question posée.

\*  
\*\*

Un grand nombre d'observations faites sur les Invertébrés apportent des exemples démontrant que l'activité sexuelle, et donc la méiose, dépend d'influences extragonadiques ; selon les espèces on connaît des facteurs stimulants et inhibiteurs.

Les recherches expérimentales faites par A. FURTADO (1977) sur la punaise responsable de la maladie de Chagas, *Panstrongylus megistus*, sont fort intéressantes. Dans l'ovaire de cet animal, les cellules germinales entrent en mitose

et se multiplient sous l'influence de certaines cellules de la pars intercerebralis. A un stade biologique déterminé, d'autres cellules de la pars intercerebralis commandent la méiose ; en fait cette commande passe par le relais des glandes thoraciques qui sécrètent de l'ecdysone : c'est cette hormone qui induit (directement ou indirectement ?) la méiose dans les cellules germinales.

Dans le cas de cette espèce, les cellules germinales peuvent donc être orientées soit vers la mitose soit vers la méiose selon les facteurs endocriniens du moment.

\*

\*\*

Il faut rappeler que chez les Vertébrés en général et chez les Mammifères en particulier, la chronologie et les modalités de la méiose sont très différentes selon le sexe. Dans le sexe masculin, les cellules germinales souches gardent une capacité mitotique pratiquement toute la vie durant. La méiose survient dans le testicule adulte, après un nombre fixe de divisions des spermatogonies. Dans le sexe féminin, les mitoses des cellules germinales s'arrêtent à un stade précis du développement fœtal lorsque débute la prophase de la première des deux divisions réductionnelles. La grande majorité des cellules germinales va alors dégénérer. Un petit nombre d'entre elles seront entourées par des cellules folliculaires, bloquées au stade diplotène de la prophase méiotique et sauvées de la mort. Dans leur noyau les chromosomes se décondensent et deviennent invisibles. Cet aspect « quiescent » durera jusqu'au moment de l'ovulation ; alors le processus méiotique interrompu reprendra et les deux divisions surviendront, selon des modalités variables. Très souvent le deuxième globule polaire n'est émis qu'après la fécondation de l'ovule.

Toute une série de questions se posent donc, en particulier : 1) pourquoi la méiose débute-t-elle dans l'ovaire fœtal et non dans le testicule fœtal ? ; existe-t-il une stimulation méiogène dans l'ébauche ovarienne, ou un facteur d'inhibition de la méiose dans le testicule fœtal, ou bien ces deux types d'action peuvent-ils être reconnus ? 2) pourquoi la méiose des ovocytes s'arrête-t-elle pendant une longue période ? et 3) pourquoi la méiose reprend-elle au moment de l'ovulation ?

\*

\*\*

En 1974, A. Grete Byskov a émis l'hypothèse selon laquelle les formations qu'elle groupe sous le nom de « rete » sont responsables de l'induction de la méiose dans l'ovaire fœtal. Les premières expériences ont consisté à suivre, en greffe, le devenir de fragments d'ovaires de fœtus de souris selon que le rete est présent ou non. Ultérieurement en cultivant côte à côte des ébauches testiculaires très jeunes avec des ovaires de fœtus de

souris plus âgés, ces derniers ont induit la méiose dans les testicules. Ces expériences mettent en évidence l'existence d'une « Meiosis Inducing Substance » (MIS). Inversement, en culture, un testicule plus âgé peut inhiber la méiose dans un ovaire plus jeune, ce qui suggère l'existence d'une « Meiosis Preventing Substance » (MPS). Le « rete » de souris ou de taureau pubère provoque l'apparition de méioses dans le testicule fœtal, dans lequel normalement il n'en survient pas, ce qui indique que ce rete adulte produit la substance induisant la méiose (GRINSTED, BYSKOV et ANDREASEN, 1979).

Certains aspects de ces recherches ont été confirmés par d'autres auteurs (O et BAKER, 1976) ou étendus à une autre espèce, le hamster (FAJER et collaborateurs, 1979). Dans d'autres Laboratoires les recherches se poursuivent.

Les expériences faites par ERICKSON (1974) sur l'embryon de poulet l'ont conduit à conclure que c'est l'épithélium superficiel (cortex) de l'ovaire qui induit la méiose dans cette espèce. Il serait intéressant de poursuivre l'investigation comparative.

\*

\*\*

En ce qui concerne l'interruption de la prophase méiotique dans l'ovaire et la reprise de la méiose au moment de l'ovulation, des recherches fort importantes ont été faites chez les Mammifères, les Etoiles de mer et les Batraciens.

Depuis l'observation initiale de G. PINCUS et E. ENZMANN (1935), on sait qu'il suffit de sortir l'ovocyte de Mammifère du follicule mûr et de le placer dans un milieu convenable, pour que la méiose reprenne. L'action inhibitrice des cellules de la granulosa des follicules a été bien démontrée par CHANG et par FOOTE et THIBAUT (1969). Parmi les nombreuses expériences faites soit sur l'animal *in vivo*, soit sur des follicules ovariens isolés et cultivés *in vitro*, soit sur des ovocytes isolés *in vitro*, on retiendra spécialement l'isolement par TSAFIRI, à partir de 1975, d'un petit peptide produit par les cellules de la granulosa, d'un poids moléculaire de 2 000 environ et qui inhibe la reprise de la méiose de l'ovocyte isolé. Ce résultat, qui attend confirmation, a soulevé beaucoup d'intérêt.

Le premier événement visible lors de la reprise de la méiose dans l'ovule est la rupture de la membrane nucléaire (« Germinal Vesicle Breakdown » des auteurs de langue anglaise ou GVBD). Les conditions métaboliques ou les modifications pharmacologiques de ce phénomène font l'objet de nombreuses recherches actuelles. Il ne semble pas, en tout cas, que les stéroïdes sexuels soient impliqués dans le processus nucléaire.

D'autre part l'ovocyte semble agir sur les cellules de la granulosa en inhibant leur lutéinisation qui survient facilement lorsque ces cellules sont isolées *in vitro*.

\*  
\*\*

Chez les étoiles de mer, comme chez les Mammifères, il y a une pause après la prophase de la première division de maturation. Il a été observé, il y a longtemps déjà, que dans certaines espèces il suffit de sortir les ovocytes mûrs de l'ovaire et de les plonger dans de l'eau de mer normale pour que la méiose reprenne. DALCQ (1925) a démontré la nécessité du calcium dans ce phénomène ; on sait aujourd'hui que le calcium agit en fait surtout sur les cellules folliculaires qui entourent les ovocytes.

Sans entrer ici dans le détail des démonstrations expérimentales, il suffit de rappeler l'essentiel des découvertes fort importantes faites par KANATANI et ses collaborateurs, et par d'autres auteurs. Le point de départ se trouve dans l'analyse du rôle du système nerveux dans l'émission des gamètes. Un extrait aqueux du nerf radial injecté dans la cavité cœlomique provoque cette émission (CHAET et MCCONNAUGHY, 1959). En fait, le polypeptide en question agit sur les cellules folliculaires, et leur fait libérer de la 1-méthyladénine (KANATANI et collaborateurs, 1969) qui, elle, est capable de réactiver la méiose des ovocytes à noyau quiescent. La méthyladénine produit un changement du cytoplasme ovocytaire qui, lui, est responsable de l'action sur le noyau : ce cytoplasme modifié injecté dans un autre ovocyte y induit la rupture de la vésicule germinative. Ce facteur cytoplasmique transmissible d'un cytoplasme ovocytaire à l'autre est amplifiable.

Les recherches de ces dernières années convergent pour indiquer que le site réel de l'action de la méthyladénine doit être à la surface de l'ovocyte, au niveau de sa membrane (KANATANI et HIRAMOTO, 1970 ; MOREAU, GUERRIER et DORÉE, 1978). L'effet de la méthyladénine sur l'ovocyte se traduit par divers changements métaboliques et spécialement par des mouvements du calcium sous-membranaire.

\*  
\*\*

Le noyau de l'ovocyte des Batraciens passe également par une phase de repos après le stade diplotène de la prophase méiotique. Au moment de l'ovulation la méiose reprend et se termine lors de la fécondation. La reprise de la méiose des Batraciens dépend d'une cascade d'influences qui, d'une manière formelle tout au moins, ressemble à celle reconnue chez les Astéries. Sans rapporter ici les démonstrations, rappelons qu'on a mis en évidence l'influence d'une gonadostimuline hypophysaire sur les cellules folliculaires, qui produisent de la progestérone (et éventuellement des stéroïdes voisins), le stéroïde agissant directement sur l'ovocyte.

La progestérone fait apparaître dans le cytoplasme de l'ovocyte un facteur de maturation (MPF) transmissible d'un ovocyte à l'autre (cette transmission peut se faire d'une espèce à l'autre sans spécificité zoologique, d'après

REYNHOUT et SMITH, 1974). On a fait récemment progresser l'analyse chimique du facteur en question, qui est de nature protéique.

Diverses recherches, dont les plus récentes font intervenir des dérivés en principe incapables de traverser la membrane cellulaire, soit de la desoxy-corticostérone (ISHIKAWA et collaborateurs, 1977) soit de la progestérone (GODEAU et collaborateurs, 1977-1978), aboutissent à la conclusion que le stéroïde agit au niveau de la membrane cellulaire. A ce sujet, il est d'ailleurs curieux que l'insuline provoque elle aussi la reprise de la maturation nucléaire. Les recherches de ces quatre ou cinq dernières années attirent l'attention sur l'importance des mouvements du calcium intra-cellulaire dans la reprise de la méiose sous l'influence de la progestérone.

\*  
\*\*

En conclusion, les diverses phases de la méiose (initiation de la prophase, blocage prolongé de celle-ci, puis reprise de la méiose) ont fait l'objet de recherches expérimentales tout à fait intéressantes mais, pour le moment, il reste encore difficile de proposer une doctrine d'ensemble pour rendre compte du contrôle de la méiose.

A. J.

#### SÉMINAIRES

Les séminaires ont comporté la discussion de quatre problèmes au sujet desquels des spécialistes ont été appelés à résumer leurs expériences et leurs points de vue.

##### 1) *Aspects du développement du système nerveux*

J. LEGRAND (Université de Montpellier) : *Hormones thyroïdiennes et développement du système nerveux : études in vivo.*

M<sup>me</sup> A. FELLOUS, J. FRANCON et J. NUNEZ (Unité de Recherches sur la glande thyroïde, I.N.S.E.R.M., Hôpital de Bicêtre) : *Hormones thyroïdiennes et différenciation neuronale : un modèle biochimique.*

F. CREPEL (Université Pierre et Marie Curie, Paris) : *Remaniements synaptiques dans le système nerveux central des rongeurs au cours du développement.*

2) *Régulation fonctionnelle de l'hypophyse fœtale et néonatale*

J.P. DUPOUY (Université d'Amiens) : *ACTH, MSH, LPH et endorphines, dans l'hypophyse fœtale.*

Ch. OLIVER (Laboratoire de Médecine expérimentale, Université de Marseille) : *Anticorps anti-TRH et anti-somatostatine et sécrétion de TSH et GH pendant la période néonatale chez le rat.*

M. RIEUTORT (Collège de France) : *Somatostatine et sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse durant la période périnatale.*

3) *Données sur la dégradation du glycogène*

H.G. HERS (Université Catholique de Louvain) : *Séquences dans la dégradation du glycogène.*

J. BOURBON (Collège de France) : *Glycogénolyse dans le poumon fœtal du rat.*

R. VAILLANT (Université de Rouen) : *Phosphorylase et amylo-1-6 glucosidase dans le foie fœtal et hormone de croissance.*

Ch. PLAS (U.E.R. d'Odontologie, Institut de Biologie moléculaire, Université Paris VII) : *Interaction du glucagon et de l'adrénaline sur la dégradation du glycogène dans les hépatocytes fœtaux de rat en culture.*

4) *Culture in vitro de fœtus et de follicules ovariens*

D.A.T. NEW (Physiological Laboratory, Cambridge, U.K.) : *In vitro culture of rat fetuses (techniques and recent aspects).*

Ch. THIBAUT et D. SZÖLLÖSI (Université Pierre et Marie Curie, et Station Physiologique, I.N.R.A., Jouy-en-Josas) : *Culture in vitro de follicules ovariens de Mammifères : aspects physiologiques.*

TRAVAUX DU LABORATOIRE

Les recherches ont porté sur divers aspects de physiologie du développement.

I. - *Développement de l'appareil génital et spécialement des gonades* (R. AGELOPOULOU, C. GIBELLO, A. JOST, S. MAGRE, J. PREPIN avec la collaboration de J. HOFFBECK, O. LOCQUET, S. PERLMAN et O. VALENTINO).

L'organogenèse du testicule commence au stade de 13 jours après la fécondation chez le fœtus de rat. Les recherches antérieures, tout d'abord faites à l'aide de coupes histologiques, ont été confirmées et précisées grâce à l'emploi du microscope électronique. L'organogenèse testiculaire débute par la différenciation en profondeur de l'ébauche, au voisinage des canaux du mésonephros, d'un type cellulaire nouveau, les cellules de Sertoli primordiales. Ces cellules augmentent de taille et se gonflent ; leur cytoplasme devient peu dense aux électrons et renferme un réticulum endoplasmique granulaire abondant sous forme de vésicules ou de courtes lames contenant un matériel floconneux. Ces cellules entourent et englobent les cellules germinales. Dès l'origine la forme prise par les cellules de Sertoli en différenciation et leur agencement sont très caractéristiques : leur surface tournée vers le mésonephros s'aplatit et dessine dans les coupes un contour régulier. Ainsi s'amorce localement et partiellement la surface externe d'un cordon séminifère en formation. Ces cellules établissent entre elles des contacts étroits sous forme soit de jonctions de type adhérents soit d'interdigitations complexes. De plus, le long de la surface externe du cordon séminifère se trouve une importante couche de microfilaments qui semblent bien jouer un rôle dans la morphogenèse du cordon testiculaire.

On obtient une différenciation de type testiculaire dans des cultures *in vitro* en milieu synthétique et an hormonal, que les transplants soient mis en culture avant (12 jours) ou juste après (13 jours) le début de la différenciation testiculaire. La qualité des cultures est améliorée si l'on ajoute de l'extrait d'embryon de poulet au milieu. Au contraire l'addition de sérum de fœtus de veau (ou de cheval) empêche la formation des cordons séminifères. Dans les coupes histologiques on aperçoit de nombreuses cellules à cytoplasme abondant, de type Sertolien, mais l'organogenèse du cordon séminifère n'est pas réalisée. Il semble que le sérum en question contienne une fraction protéique qui empêche l'association des cellules sans empêcher leur différenciation morphologique. L'étude de ces phénomènes est encore en cours. Les résultats, dans leur état actuel, seront présentés au Premier Congrès français d'Endocrinologie, à Montpellier, en septembre 1980.

Les recherches sur la prophase de la méiose dans l'ovaire du fœtus de rat et sur les facteurs susceptibles soit de la provoquer soit de l'inhiber ont progressé, mais il a fallu associer deux techniques laborieuses pour réaliser une étude assez précise et quantitative. Les stades de la méiose s'identifient bien sur des préparations de cellules ovariennes dispersées ; les ovogonies, avant l'entrée en méiose, se reconnaissent mieux dans les

coupes histologiques. L'analyse des modalités de l'influence testiculaire sur les prophases méiotiques intraovariennes, *in vitro*, est en cours de réalisation.

On a d'autre part, à titre d'information, testé l'influence éventuelle sur l'apparition de la méiose dans les cultures d'ovaire de rat de divers facteurs qui se sont révélés sans action majeure (œstrogènes, anti-œstrogènes, ecdysone, hormone juvénile).

#### PUBLICATION

A. JOST, *Différenciation sexuelle* (In : *Développement Prénatal Normal et Pathologique*, A. Boué, R. Henrion et G. David eds. *Collection Pédiatrie*, 1980, p. 287-304. Flammarion Médecine-Sciences, Paris).

II. - *Régulation de la sécrétion d'insuline et d'hormone somatotrope chez le fœtus et le nouveau-né* (A. KERVAN, J. RANDON et M. RIEUTORT).

##### 1) *Contrôle de la sécrétion d'insuline par le pancréas du fœtus de rat*

On a poursuivi l'étude de la maturation fonctionnelle de la cellule B du pancréas endocrine chez le fœtus de rat. La périfusion *in vitro* de morceaux de pancréas ou d'îlots de Langerhans isolés par la collagénase a permis de préciser les caractéristiques de la sécrétion d'insuline.

La cinétique de libération d'insuline par les îlots de fœtus de 21,5 jours en réponse à une augmentation de la concentration de glucose est de type biphasique. L'amplitude de la première phase est identique dans les îlots de fœtus et d'adultes ; celle de la deuxième phase est quatre fois plus faible chez le fœtus que chez l'adulte. La latence qui précède l'établissement de la réponse insulinaire et les paramètres qui caractérisent les courbes de sécrétion d'insuline induite par des concentrations croissantes de glucose sont très voisins de ceux rapportés pour l'adulte. Les étapes essentielles de la sécrétion d'insuline sont donc présentes dans les cellules B du fœtus de rat à terme, la différence majeure étant d'ordre quantitatif.

Le développement de la sensibilité des cellules B à différents peptides hormonaux est en cours d'étude. La libération d'insuline induite *in vitro* par le glucose est inhibée en présence de concentrations élevées de somatostatine (2 µg/ml) dès 19,5 jours de gestation. Le peptide inhibiteur gastrique (G.I.P.) qui chez l'adulte est libéré par le duodénum lors de l'ingestion des aliments et stimule la libération d'insuline, potentialise dès la naissance l'action insulino-sécrétoire du glucose.



## 2) Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance

L'étude de la mise en place du contrôle hypothalamique de la sécrétion de l'hormone de croissance a été poursuivie chez le rat et le lapin.

Chez le rat, on a pu montrer, *in vitro*, que le système adénylcyclasique des cellules somatotropes de l'hypophyse fœtale est fonctionnel dès que l'hormone est détectable dans la glande. Les hypophyses de fœtus de 19,5 jours secrètent activement de l'hormone de croissance en réponse à des stimulations par l'AMP cyclique, la théophylline ou les prostaglandines (PGE<sub>1</sub> et PGE<sub>2</sub>). La sécrétion d'hormone de croissance est également stimulée par des extraits d'éminence médiane de rat adulte. Par contre, la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse de fœtus ou de nouveau-nés âgés de moins de 3 à 4 jours n'est freinée par la somatostatine ni *in vivo*, ni *in vitro*. La sensibilité de l'hypophyse à la somatostatine n'apparaît que 4 jours après la naissance.

Ces résultats permettent d'intégrer, d'un point de vue physiologique, les données de la littérature relatives à l'évolution des relations anatomiques entre l'hypothalamus et l'hypophyse et à celle des concentrations de somatostatine dans l'hypothalamus du jeune rat.

Chez le lapin, les résultats préliminaires obtenus *in vitro*, indiquent que la sécrétion d'hormone de croissance par des hypophyses de fœtus âgés de 30 et 31 jours peut être bloquée par la somatostatine.

## PUBLICATIONS

A. KERVRAN, J. RANDON et J.R. GIRARD, *Dynamics of glucose-induced plasma insulin increase in the rat fetus at different stages of gestation : effects of maternal hypothermia and fetal decapitation (Biol. Neonate, 1979, 35, 242-248).*

J. RANDON et A. KERVRAN, *Cinétique de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les îlots de Langerhans isolés de fœtus de rat (C.R. Acad. Sci., Paris, 1979, 288, 1567-1570).*

A. KERVRAN et J. RANDON, *Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro : effects of glucose, amino acids and theophylline (Diabetes, 1980, 29, 673-678).*

M. RIEUTORT, *Ontogenetic development of the inhibition of growth hormone release by somatostatin in the rat (In : Neuroactive Drugs in Endocrinology, p. 21, E.E. Müller, ed., Ricerca Scientifica ed Educazione Permanente, Milan, 1979).*

III. - *Métabolisme du glycogène dans le foie et le poumon du fœtus* (J. BOURBON, M. GILBERT et A. JOST).

Le foie et le poumon des fœtus de mammifère accumulent du glycogène au cours de la gestation. L'accumulation est plus précoce dans le poumon, et le glycogène pulmonaire commence à disparaître avant la fin de la gestation, en relation sans doute avec l'élaboration du surfactant. Le glycogène hépatique continue à s'accumuler jusqu'au terme et disparaît après la naissance, sa fonction étant de servir de réserve énergétique au nouveau-né. Ces événements sont soumis à un contrôle hormonal dont on a étudié certaines modalités.

1) *Métabolisme du glycogène dans le foie*

Le dépôt du glycogène dans le foie fœtal dépend d'un double contrôle hormonal par les corticostéroïdes et par une hormone hypophysaire, vraisemblablement l'hormone somatotrope (chez le lapin), ou placentaire (chez le rat). Le rôle respectif de chaque hormone reste mal compris.

On a essayé d'analyser les effets d'une privation hormonale sur le développement de certaines activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme du glycogène. Chez le fœtus de rat, la suppression des corticostéroïdes par décapitation des fœtus et surrénalectomie des mères, empêche le développement de la glycogène synthase et de l'enzyme branchant. L'administration de corticostéroïdes rétablit le développement de ces enzymes. La privation de corticostéroïdes empêche aussi le développement de la glycogène synthase phosphatase, l'enzyme qui convertit la synthase de sa forme inactive en sa forme active.

Chez le fœtus de lapin, la suppression des hormones hypophysaires par décapitation empêche le développement de la glycogène synthase mais n'affecte pas l'activité de la synthase phosphatase. Les effets de l'hormone de croissance sur l'activité de la glycogène synthase chez les fœtus décapités sont à l'étude.

2) *Métabolisme du glycogène dans le poumon*

Chez le fœtus de rat, la suppression des corticostéroïdes endogènes n'empêche pas l'accumulation du glycogène pulmonaire. Les corticostéroïdes ne sont donc pas nécessaires à l'accumulation du glycogène dans le poumon, contrairement à ce qu'on observe dans le foie des mêmes fœtus.

Le glycogène pulmonaire peut être dégradé par deux mécanismes différents. Le premier fait intervenir la glycogène phosphorylase ; le second une hydrolyse par une amyloglucosidase acide dans des vacuoles d'autophagie d'origine lysosomiale (J. BOURBON). L'activité de la phosphorylase, de l'amyloglucosi-

dase acide et l'activité autophagique du tissu augmentent en fin de gestation chez le fœtus de rat. La décapitation du fœtus *in utero* retarde la disparition du glycogène pulmonaire. L'activité de la phosphorylase est plus faible et l'activité autophagique du tissu est diminuée. L'injection d'hormone somatotrope au fœtus décapité restaure l'activité de la phosphorylase, mais le contenu pulmonaire en glycogène reste supérieur à la normale. Chez le fœtus entier, l'hormone de croissance exogène provoque une augmentation anticipée de la phosphorylase dans le poumon.

L'injection de cortisol au fœtus décapité restaure l'activité autophagique du poumon ; elle provoque une augmentation anticipée de l'activité autophagique du poumon du fœtus entier.

#### PUBLICATIONS

M. GILBERT et J. BOURBON, *Effects of an acute variation of fetal glycemia on glycogen storage and on glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the rat fetus (Diabetes, 1980, 29, 266-271).*

J. BOURBON et M. GILBERT, *Role of fetal insulin in glycogen metabolism in the liver of the rat fetus (Biol. Neonate, 1980, sous presse).*

J. BOURBON, J.R. GIRARD et A. JOST, *Hormonal control of carbohydrate metabolism in the perinatal period (In : Clinical Perinatology, S. Aladjem, A.K. Brown et C. Sureau, eds, p. 68-80. C.V. Mosby, St Louis, 1980).*

IV. - *Métabolisme maternel au cours de la gestation (P. FERRE, M. GILBERT, J. GIRARD, A. LETURQUE, J.P. PEGORIER et P. SATABIN).*

1) *Rôle du flux sanguin placentaire et de la taille du placenta dans la croissance pondérale du fœtus de rat*

La technique des microsphères radioactives a été utilisée pour mesurer le débit sanguin placentaire chez des fœtus présentant à terme un retard de croissance intrautérin. La ligature de l'artère utérine à 16,5 jours de gestation provoque des variations importantes du poids des fœtus à terme (2.6 g au lieu de 5.3 g). Il existe une relation directe entre la diminution du débit sanguin placentaire et le poids du fœtus. Le poids du placenta ne diminue que lorsque le flux sanguin diminue de plus de 50 %.

Après un jeûne maternel de 48 heures, le poids fœtal est diminué de 20 % et le flux sanguin placentaire de 50 %, alors que le poids du placenta n'est pas affecté. Chez le Rat, il n'y a donc pas de relation directe entre le poids du fœtus et celui du placenta. Par contre le flux sanguin placentaire et le poids fœtal sont en étroite corrélation.

2) *Métabolisme de la ratte gestante éveillée et non restreinte*

La technique d'implantation chronique d'un cathéter dans le système vasculaire, mise au point l'année dernière chez le cobaye par le P<sup>r</sup> F. BATTAGLIA a été étendue à la ratte (M. GILBERT). Cette technique permet des prélèvements de sang chez l'animal éveillé et non restreint. La mesure journalière des concentrations des différents substrats plasmatiques a permis une étude du métabolisme maternel pendant la seconde moitié de la gestation. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus chez des rattes non gestantes dans les mêmes conditions expérimentales. Chez les rattes non gestantes, la prise alimentaire est normale 24 heures après l'opération et elle reste constante pendant les jours qui suivent. Il en est de même des concentrations des substrats plasmatiques (glucose, lactate, pyruvate, glycérol, acides gras libres, corps cétoniques). Chez les rattes gestantes portant un cathéter (entre 13 et 21 jours de gestation) la prise alimentaire et le gain de poids journaliers sont semblables à ceux mesurés chez des animaux non opérés ; la glycémie chez les rattes non gestantes. Ces études montrent que la diminution de la glycémie de la ratte gestante s'instaure pendant la première moitié de la gestation. Les fœtus ne semblent pas responsables de cette diminution car à ce stade la masse embryonnaire est très faible. L'augmentation de la liporeste stable et égale à 75 % de la valeur des rattes non gestantes. Les concentrations de lactate et de pyruvate ne sont pas affectées par la gestation. Les concentrations d'acides gras libres sont respectivement 2 et 5 fois plus élevées à 13 et 21 jours de gestation que chez les rattes non gestantes. La glycérolémie est environ deux fois et demie plus élevée à 13 et à 21 jours de gestation, avec une diminution significative à 15 et 16 jours. La concentration des corps cétoniques est inchangée et égale à celle mesurée en début de gestation, décrite par d'autres auteurs, pourrait être un élément contribuant à la chute de la glycémie.

3) *Renouvellement du glucose pendant la gestation*

Au cours de la gestation la femelle doit satisfaire les exigences métaboliques de ses propres tissus et de ses fœtus. Afin d'apprécier l'influence de la gestation sur le métabolisme glucidique, nous avons étudié le renouvellement du glucose plasmatique chez la ratte. La technique de mesure consiste à **perfuser à débit constant (F) une quantité traceuse de [6-<sup>3</sup>H] et de [U-<sup>14</sup>C] glucose pendant 1 heure, afin de maintenir constantes les radioactivités spécifiques du glucose plasmatique (AS). La quantité de glucose renouvelée  $R_T$  est alors égale à  $F/AS$ , et le recyclage de <sup>14</sup>C est donné par la différence entre le renouvellement mesuré avec le glucose U<sup>14</sup>C et le glucose <sup>3</sup>H.**

A 14 jours de gestation le renouvellement du glucose est identique à celui mesuré chez la ratte vierge, puis il augmente entre 18 et 21 jours. En

pratiquant une fœtectomy à 14 jours et en laissant les placentas *in situ*, on constate que le renouvellement du glucose n'est pas plus élevé 21 jours après le début de la gestation que celui mesuré chez la ratte vierge. L'augmentation du renouvellement du glucose chez la ratte gestante est donc liée à la présence des fœtus. A 14 jours de gestation le pourcentage de  $^{14}\text{C}$  recyclé est identique à celui mesuré chez la ratte vierge, puis il diminue à 18 et 21 jours. Ces faits suggèrent que le lactate et le pyruvate participent moins à la production de glucose et que ces substrats pourraient être orientés préférentiellement vers les fœtus.

#### 4) Résistance à l'insuline pendant la gestation

Chez la femme, le dernier trimestre de la gestation s'accompagne d'une résistance à l'insuline qui peut être à l'origine d'un diabète gestationnel. La ratte est le seul modèle animal où une résistance à l'insuline a été décrite au cours de la gestation sans toutefois être caractérisée. Afin de préciser la nature de cette résistance à l'insuline, deux types d'expérience ont été réalisés : 1) des tests de tolérance au glucose pratiqués chez des rattes vierges et chez des rattes à différents stades de la gestation (entre 16 et 21 jours) : alors que la constante de disparition du glucose des rattes gestantes est semblable à celle des rattes vierges, quel que soit le stade de la gestation, les rattes gestantes secrètent significativement plus d'insuline que les rattes vierges ; il existe donc chez la ratte une résistance relative à l'insuline endogène en fin de gestation. 2) On a mesuré l'utilisation, la production et la clairance du glucose en réponse à une dose d'insuline (4 U/kg) supra-maximale (c'est-à-dire provoquant une réponse biologique maximale) et à deux doses sous-maximales (150 et 50 mU/kg), chez la ratte vierge et chez la ratte à 19 jours de gestation. Ces expériences montrent que pour la dose supramaximale d'insuline, il n'existe aucune différence entre rattes vierges et gestantes en ce qui concerne l'hypoglycémie, la production et l'utilisation du glucose. Toutefois la clairance basale est plus élevée et elle est plus stimulée chez la ratte gestante que chez la ratte vierge. Ceci indique l'existence de sites supplémentaires d'utilisation du glucose chez la ratte gestante (fœtus, placenta, tissu adipeux, glande mammaire). Pour les deux doses sous-maximales d'insuline, l'hypoglycémie est plus faible chez la ratte gestante, la production de glucose n'est pas inhibée et la clairance, exprimée en % de l'effet maximal (4 U/kg), est moins augmentée que chez les rattes vierges. On peut donc conclure que la résistance à l'insuline est caractérisée chez la ratte gestante par une diminution de la sensibilité à l'hormone, qui touche à la fois les tissus producteurs (foie) et les tissus utilisateurs (muscle) de glucose.

PUBLICATIONS

M. GILBERT et A. LETURQUE, *Renouvellement du glucose plasmatique chez la ratte vierge et la ratte gestante* (*J. Physiol.*, Paris, 1979, 75, 81 A).

A. LETURQUE, P. FERRE et J. GIRARD, *Résistance à l'insuline des tissus périphériques de la ratte gestante* (*J. Physiol.*, Paris, 1979, 75, 82 A - 83 A).

M. GILBERT, P. BESNARD et J.M. GAREL, *Effects of maternal parathyroid glands and vitamin D<sub>3</sub> metabolites on fetal growth and fetal liver glycogen stores in thyroparathyroidectomized pregnant rats* (*Biomedicine*, 1980, 32, 93).

M. GILBERT et A. LETURQUE, *Placental blood flow in rat and its relation to placental and fetal weight* (*Proc. Intern. Symp. on Primate and non Primate Placental Transfer*, 1980, sous presse).

A. LETURQUE, P. FERRE, P. SATABIN et J.R. GIRARD, *Insulin resistance during pregnancy in the rat* (*Diabetologia*, 1980, sous presse).

V. - *Métabolisme énergétique du nouveau-né* (S. CALLIKAN, L. EL MANOUBI, P. FERRE, J. GIRARD et P. TURLAN).

Les recherches ont été poursuivies en étudiant plus particulièrement deux aspects :

1) *Mesure du taux de renouvellement du glucose chez le rat nouveau-né. Interrelations avec le métabolisme du lactate*

Afin d'estimer l'importance quantitative de la production endogène de glucose dans le maintien de l'homéostasie glucidique du rat nouveau-né, on peut comparer les apports exogènes de glucose (obtenus simplement en multipliant la teneur en glucose du lait par la quantité de lait consommée par jour) et l'utilisation totale de glucose estimée en mesurant son taux de renouvellement. Ce dernier paramètre a été déterminé chez le rat nouveau-né allaité maintenu à 37 °C en utilisant une technique de perfusion continue de glucose (6)-<sup>3</sup>H par voie intrapéritonéale. Ces études montrent que le taux de renouvellement du glucose est deux fois plus élevé par unité de poids chez le rat nouveau-né allaité que chez l'adulte nourri et d'autre part que les apports exogènes en glucose (lait) ne peuvent contribuer qu'à 10 % des besoins en glucose, la gluconéogenèse assurant les 90 % restants. Toutefois, une partie du glucose utilisé n'est pas totalement oxydée et peut donc, en produisant des intermédiaires métaboliques comme le lactate, le pyruvate et

l'alanine, redonner du glucose dans le foie (recyclage). Les besoins réels du nouveau-né sont donc plus faibles que le taux de renouvellement global du glucose. Afin de déterminer ce recyclage et l'importance du lactate, les rats nouveau-nés allaités ont été perfusés avec du glucose (U)-<sup>14</sup>C ou du lactate (U)-<sup>14</sup>C. Ces expériences suggèrent que, comme chez le rat adulte à jeun, il existe un recyclage du glucose représentant 20 % du taux de renouvellement du glucose et celui-ci s'effectue essentiellement par l'intermédiaire du lactate.

2) *Mise au point d'une technique d'isolement d'hépatocytes de rats nouveau-nés. Application à l'étude des interrelations acides gras - gluconéogenèse*

Les modifications du métabolisme hépatique qui accompagnent la naissance (mise en place de la gluconéogenèse et de la cétogenèse) ont été étudiées jusqu'ici sur l'animal entier. Les études *in vivo*, ne permettent pas de préciser l'évolution quantitative et les régulations de ces deux voies métaboliques. C'est pourquoi on a mis au point une technique d'isolement d'hépatocytes de rats nouveau-nés très semblable à celle utilisée chez l'adulte : perfusion du foie par un milieu Krebs-Henselheit sans calcium contenant de la collagénase, puis dispersion des cellules par agitation mécanique. La petite taille des animaux nécessite la perfusion simultanée de 6 foies, celle-ci s'effectuant par la veine cave avec un écoulement du liquide par la veine porte (rétroperfusion). L'incubation des hépatocytes de rats nouveau-nés a montré que chez les animaux allaités, la gluconéogenèse à partir de lactate (10 mM) était deux fois plus active que chez l'adulte à jeun. Chez les nouveau-nés à jeun, la gluconéogenèse et la cétogenèse sont très faibles ; elles sont fortement stimulées par addition d'oléate ou d'octanoate (2 mM). Une oxydation active d'acides gras est donc absolument nécessaire *in vitro* (comme *in vivo*) pour maintenir une activité gluconéogénétique maximale chez le nouveau-né.

#### PUBLICATIONS

S. CALLIKAN et J. GIRARD, *Perinatal development of gluconeogenic enzymes in rabbit liver (Biol. Neonate, 1979, 36, 78-84).*

P. FERRE, J.P. PEGORIER, D.H. WILLIAMSON et J.R. GIRARD, *In vivo interactions between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in newborn rat (Biochem. J., 1979, 182, 593-598).*

J.R. GIRARD et S. CALLIKAN, *Energy metabolism and fetal growth (Bull. Intern. Pediat. Ass., 1979, 3, 20-28).*

S. CALLIKAN, P. FERRE, J.P. PEGORIER, E.B. MARLISS, R. ASSAN et J.R. GIRARD, *Fuel metabolism in fasted newborn rabbits (J. Develop. Physiol., 1979, 1, 267-281).*

J.R. GIRARD, P. FERRE, J.P. PEGORIER, A. LETURQUE et S. CALLIKAN, *Factors involved in the development of hypoglycemia in fasting newborn rats (In : Current Views on Hypoglycemia and Glucagon, D. Andreani, P.J. Lefebvre et V. Marks, eds, p. 343-353 ; Academic Press, N.Y., 1980).*

P.F. BOUGNERES, J.M. SAUDUBRAY, C. MARSAC, O. BERNARD, M. ODIEVRE et J.R. GIRARD, *Decreased ketogenesis due to deficiency of hepatic carnitine acyltransferase (New England J. Med., 1980, 302, 123-124).*

S. CALLIKAN, P. FERRE, L. EL MANOUBI et J.R. GIRARD, *Interactions between hepatic gluconeogenesis and non-esterified fatty acid oxidation in hepatocytes from 1 day old rats (Biochem. Soc. Transac., 1980, 8, sous presse).*

#### ACTIVITÉS DIVERSES

M. Alfred JOST a été invité à faire un exposé à la réunion de la « European Society for human Genetics » à Southampton (juillet 1979). Il a été l'un des « invités spéciaux » du IX<sup>e</sup> Congrès Mondial de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique qui s'est tenu à Tokyo en octobre 1979 ; il a aussi donné une conférence à l'Université de Tokushima.

M. Jean GIRARD, Sous-Directeur du Laboratoire, a été invité à faire des exposés aux réunions suivantes : Symposium « Pregnancy & Fetal development » organisé par le National Diabetes Advisory Board (Washington, octobre 1979) ; Symposium « The physiological and biochemical basis for perinatal Medicine » (Paris, décembre 1979) ; Symposium « Antenatal factors affecting glucose metabolism in the newborn » (Bruxelles, décembre 1979). Il a également participé au congrès international sur le Diabète (Vienne, septembre 1979) et à la réunion annuelle de la Biochemical Society (Sheffield, juillet 1980) et à la Karolinska Institute Nobel Conference on the Biology of Normal Human Growth (Stockholm, août 1980).

M. Alain KERVAN a été invité à donner deux conférences à l'Université de Uppsala (Suède, avril 1980) sur la « maturation fonctionnelle du pancréas endocrine chez le fœtus et le nouveau-né de rat ».

M. Michel RIEUTORT a participé au premier Symposium International « Neuroactive drugs in Endocrinology » (Milan, septembre 1979) et au



Symposium International « Fetal Medicine » (Venise, juin 1979). Il a été invité au Colloque « Neuropeptides : *quo vadis?* » organisé par le Centre de Recherches Clin-Midy (Montpellier, mai 1980).

M. Soomant CALLIKAN a présenté ses résultats à la réunion du « Groupe d'études sur les hépatocytes isolés ou en culture » (Rennes, mars 1980).

M<sup>lle</sup> Armelle LETURQUE et Marc GILBERT ont présenté leurs résultats à la réunion des Physiologistes de Langue Française (Lyon, septembre 1979), et au symposium international « Primate and non-primate placental transfer » (Rotterdam, juin 1980).

M. Pascal FERRE a présenté ses résultats à la réunion des physiologistes de langue française (Lyon, septembre 1979) et à la réunion annuelle de la Biochemical Society (Sheffield, juillet 1980). Il a été invité à faire un exposé au symposium international « Antenatal Factors affecting Glucose Metabolism in the Newborn » (Bruxelles, décembre 1979).

#### THÈSES

M. Jacques RANDON a soutenu, en novembre 1979, sa thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle (Endocrinologie) intitulée : *Etude de la réponse de la cellule B du pancréas à différents stimuli au cours du développement du fœtus de rat* (Université Pierre et Marie Curie).

M. Alain KERVAN a soutenu, en mars 1980, sa thèse de Doctorat d'Etat intitulée : *Développement fonctionnel de la cellule B du pancréas endocrine chez le fœtus et le nouveau-né de rat* (Université Pierre et Marie Curie).

M. Jacques BOURBON a soutenu, en mai 1980, sa thèse de Doctorat d'Etat intitulée : *Etude comparative du contrôle hormonal du métabolisme du glycogène dans le foie et dans le poumon du fœtus de rat et de lapin* (Université Pierre et Marie Curie).

M. Michel RIEUTORT a soutenu, en mai 1980, sa thèse de Doctorat d'Etat intitulée : *Sécrétion de l'hormone somatotrope au cours du développement du rat et du lapin : ontogenèse de la régulation et aspects fonctionnels* (Université Pierre et Marie Curie).

M. Soomant CALLIKAN a soutenu, en juin 1980, sa thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle (Nutrition) intitulée : *Régulation de la gluconéogenèse in vivo et dans les cellules hépatiques isolées de Lapin pendant la période périnatale* (Université Paris VII).

M<sup>lle</sup> Armelle LETURQUE a soutenu, en juin 1980, sa thèse de Doctorat de 3<sup>e</sup> cycle (Biologie du développement) intitulée : *Métabolisme glucidique chez la ratte gestante. Renouvellement du glucose. Résistance à l'insuline* (Université Paris VII).