

Physiologie du développement

M. Alfred JOST, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Le cours n'a pas eu lieu.

SÉMINAIRES

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

1) *Signal nerveux, synaptogenèse et différenciation neuro-musculaire*

D. RENAUD (Université de Nantes) : Technique de stimulation médullaire chronique chez l'embryon d'Oiseau.

G. LE DOUARIN (Université de Nantes) : Modification expérimentale de l'activité des motoneurones au cours du développement embryonnaire.

2) *Glucocorticoïdes et érythropoïèse hépatique fœtale*

J.M. FELIX (Université de Reims) : Introduction.

P. MAYEUX (Université de Reims) : Aspects biochimiques.

C. BILLAT (Université de Reims) : Cultures en milieu semi-solide.

3) *Structure et génétique du chromosome Y*

M. FELLOUS (Immunogénétique humaine, Institut Pasteur) : Introduction générale. Difficulté de l'étude de l'antigène HY.

C. BISHOP (Immunogénétique humaine, Institut Pasteur) : Méthode de clonage du chromosome Y chez l'homme et la souris. Structure du chromosome Y. Homologie avec le chromosome X.

M. CASANOVA (Immunogénétique humaine, Institut Pasteur) : Application à certaines erreurs de la détermination précoce du sexe : mâle XX, hermaphroditisme vrai XX, dysgénésie sexuelle XY.

4) *Physiologie des cellules de Leydig*

M. BENHAMED (I.N.S.E.R.M., Hôpital Debrousse, Lyon) : Relations fonctionnelles entre cellules de Sertoli et cellules de Leydig : aspects biochimiques.

E. TABONE (I.N.S.E.R.M., Hôpital Debrousse, Lyon) : Relations fonctionnelles entre cellules de Sertoli et cellules de Leydig : aspects morphologiques.

E. PATSAVOUDI et S. MAGRE (Collège de France) : Différenciation fonctionnelle des cellules de Leydig indépendamment de l'organogenèse des cordons séminifères chez le fœtus de rat.

5) *Développement du poumon*

P. FARRELL (Université de Madison, Wisconsin, U.S.A.) : Utilization of lung glycogen for surfactant phospholipid synthesis.

TRAVAUX DU LABORATOIRE

I. *Différenciation des glandes génitales*

a) *Différenciation du testicule fœtal* (R. AGELOPOULOU, I. CHARTRAIN, A. JOST, S. MAGRE, E. PATSAVOUDI, avec la collaboration de M. CASTANIER et R. SCHOLLER).

Le mécanisme de différenciation du testicule fœtal observé chez le fœtus de rat par A. JOST (1972) a été étendu au fœtus de lapin. La formation des cordons séminifères, les futurs tubes séminifères, débute par l'apparition dans l'ébauche différenciée d'un nouveau type cellulaire, les cellules de Sertoli. En s'accolant les unes aux autres, ces cellules constituent peu à peu les cordons séminifères.

L'étude de la différenciation testiculaire du fœtus de rat a été poursuivie. On avait constaté antérieurement que des ébauches gonadiques indifférenciées,

cultivées *in vitro* dans un milieu synthétique, réalisent l'organogenèse testiculaire. Cette organogenèse est empêchée si l'on ajoute du sérum au milieu de culture. Dans ce cas, les cellules de Sertoli fœtales se différencient morphologiquement, mais les cordons séminifères ne se forment pas. Elles produisent en particulier l'inhibiteur Müllérien qui peut être considéré comme un marqueur de leur activité.

Le travail récent a consisté à rechercher si la différenciation des cellules de Leydig peut être obtenue en l'absence d'organogenèse testiculaire. Pour mettre en évidence la présence éventuelle de cellules de Leydig, on a utilisé d'une part, des méthodes histochimiques de détection de l'enzyme $\Delta 5-3 \beta$ -hydroxystéroïde-deshydrogénase, d'autre part, le dosage de la testostérone dans le milieu de culture. Les gonades ont été mises en culture à des stades de la gestation (de 12,5 à 14,5 jours) qui précèdent la date d'apparition des cellules de Leydig *in vivo* (15,5 jours).

L'absence d'organogenèse testiculaire n'empêche pas et ne retarde pas la différenciation des cellules de Leydig. Les tests histochimiques, ainsi que le dosage de testostérone, montrent que les cellules de Leydig se différencient au même stade, que les gonades aient ou non acquis une structure testiculaire.

Cependant, les gonades développées en présence de sérum et dans lesquelles l'organogenèse testiculaire est empêchée, produisent une quantité de testostérone plus faible que celles qui ont acquis la structure testiculaire en l'absence de sérum. Il sera intéressant d'étudier les relations fonctionnelles éventuelles entre les cordons séminifères bien constitués et les cellules de Leydig du testicule fœtal.

b) Cellules germinales dans l'ovaire fœtal (J. PREPIN et G. CHARPENTIER)

On a étudié l'évolution du nombre des cellules germinales dans des ovaires de fœtus de Rat explantés à 13 jours et cultivés *in vitro* dans un milieu an hormonal. Le nombre de cellules germinales augmente pendant les 4 premiers jours, passe par un maximum puis diminue considérablement au cours des 2 jours suivants. On observe donc, dans les cultures *in vitro*, un maximum du nombre des cellules germinales dans l'ovaire fœtal, suivi par une forte diminution. *In vitro* la disparition rapide des cellules germinales coïncide avec le début de la prophase méiotique. La raison pour laquelle cette phase nucléaire coïncide avec la disparition d'un grand nombre de cellules germinales n'est pas connue.

D'autre part, on a continué l'analyse des effets de milieux conditionnés par la culture de testicules de fœtus de Rat, sur le nombre des cellules germinales des ovaires cultivés *in vitro*. L'augmentation du nombre de ces

cellules survenant dans les ovaires explantés à 13 jours est en grande partie empêchée par ces milieux. L'analyse est en cours.

PUBLICATIONS

A. JOST, E. PATSAVOUDI, S. MAGRE, M. CASTANIER, R. SCHOLLER, *Relations entre organogénèse testiculaire et sécrétion de testostérone par le testicule fœtal in vitro* (*Pathologie Biologie*, sous presse).

S. MAGRE, E. PATSAVOUDI, A. JOST, M. CASTANIER et R. SCHOLLER, *Dissociation entre organogénèse et différenciation endocrine du testicule de rat in vitro* (Colloque I.N.S.E.R.M., avril 1984, sous presse).

R. AGELOPOULOU, S. MAGRE, E. PATSAVOUDI et A. JOST, *Initial phases of the rat testis differentiation in vitro* (*J. Embryol. exp. Morphol.*, sous presse).

II. *Développement du poumon fœtal* (J. BOURBON, E. DOUCET, B. PIGNOL et M. RIEUTORT, en collaboration avec M^{mes} L. MARIN, C. TORDET et M. J.P. RELIER, I.N.S.E.R.M. U 29 et MM. P.M. FARRELL et M. ENGLE, Université du Wisconsin, Madison, U.S.A.)

Les travaux sur le développement du poumon ont comporté deux enquêtes, la différenciation de l'épithélium respiratoire dans les poumons cultivés *in vitro* et les anomalies du développement du poumon du fœtus de mère diabétique.

1) *Différenciation pulmonaire in vitro, rôle du glycogène dans la maturation*. Divers travaux antérieurs, y compris ceux de notre laboratoire, ont mis en évidence l'aptitude d'explants de poumon fœtal indifférencié à différencier *in vitro* dans un milieu sans sérum ni hormone, des cellules caractéristiques de l'épithélium respiratoire, les pneumocytes de type II. Ces cellules sont responsables de la biosynthèse du surfactant pulmonaire qui s'y accumule sous la forme d'inclusions lamellaires. Le choix du milieu de culture n'est pas indifférent pour ce type d'étude. Dans le milieu de Waymouth (MB 752/1), la différenciation est anticipée par rapport à la chronologie normale *in vitro* et le tissu accumule des phospholipides caractéristiques du surfactant, principalement de la phosphatidylcholine saturée. Dans le milieu RPMI 1640, des inclusions lamellaires apparaissent en culture, mais sans anticipation par rapport au développement normal et sans accumulation importante de phospholipides. En outre, dans ce milieu, le mésenchyme périclité alors qu'il survit mieux dans le milieu de Waymouth. Les différences de composition

entre ces deux milieux sont nombreuses. Nous avons vérifié que ce n'est pas la teneur en choline qui explique la différence dans les résultats. Nos observations expliquent certaines contradictions entre les études antérieures réalisées à l'aide de milieux différents. L'étude des meilleures conditions de culture, permettant une synthèse maximale des phospholipides caractéristiques du surfactant *in vitro* est en cours. Remplacer le milieu liquide habituel par un milieu solidifié par de la gélose améliore considérablement la survie des explants. Une comparaison systématique de divers milieux de culture commercialisés a permis de rechercher les plus favorables : Waymouth MB 752/1 et CMRL 1066 sont excellents et HAM's F 12 assez bon.

Les études entreprises avec Ph. FARRELL, en 1980, sur le rôle du glycogène dans la maturation de l'épithélium respiratoire sont actuellement poursuivies, Ph. FARRELL effectuant un séjour sabbatique au Laboratoire. Il avait été constaté qu'il existe une relation précurseur-produit entre le glycogène accumulé à des stades précoces par le poumon fœtal et la phosphatidylcholine synthétisée en fin de gestation. On vient de constater que la phosphatidylcholine synthétisée se trouve essentiellement dans la fraction surfactant (isolée par ultracentrifugation) des phospholipides du tissu, et que le glycogène fournit sans doute des précurseurs pour la biosynthèse des acides gras de la phosphatidylcholine.

2) *Développement du poumon de fœtus de mère diabétique.* Dans l'espèce humaine le diabète maternel (particulièrement le diabète dit gestationnel) est une cause de retard de maturation du poumon fœtal, entraînant un risque accru de détresse respiratoire à la naissance.

Le travail a eu pour but de définir les rôles de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie réactionnelle du fœtus, deux paramètres qui avaient été incriminés par les études antérieures dans les mécanismes conduisant à l'immaturité pulmonaire. Nous avons tiré avantage de ce que, chez le rat, la réponse du pancréas fœtal à l'hyperglycémie dépend du degré de gravité du diabète maternel : avec un diabète faible ou modéré, le pancréas fœtal est stimulé, et les fœtus présentent une hyperinsulinémie ; avec un diabète sévère, les fœtus présentent au contraire une hypoinsulinémie (KERVRAN, GUILLAUME et JOST, 1978). Nous avons induit des diabètes de sévérité graduée, chez la ratte gestante, en injectant des doses variables de streptozotocine. Chez les fœtus de mères modérément diabétiques, on observe un retard du développement morphologique (diminution du nombre de cellules différenciées ou du volume des inclusions lamellaires, à un stade donné) et biochimique du poumon (diminution de la quantité de phosphatidylcholine saturée dans le tissu et le surfactant intra-alvéolaire). La phosphatidylcholine saturée semble spécifiquement diminuée dans ce modèle par rapport aux autres phospholipides qui ne sont pas modifiés.

Les fœtus hypo-insuliniques de mères sévèrement diabétiques montrent à la fois une immaturité morphologique et une diminution de la phosphatidylcholine saturée et du phosphatidylglycérol. D'autres phospholipides essentiellement membranaires sont également diminués. L'utilisation du glycogène par le poumon fœtal est considérablement réduite par le diabète modéré (beaucoup moins par le diabète sévère).

L'ensemble de ces résultats suggère que, suivant la gravité du diabète, les modifications biochimiques pourraient être différentes. L'hyperinsulinémie fœtale semble bien impliquée dans le retard du développement pulmonaire dans le cas du diabète modéré.

Des injections répétées d'insuline au fœtus de ratte normale, ont confirmé l'effet retardant de l'insuline sur le développement pulmonaire, effet qui avait précédemment été mis en évidence *in vitro*.

L'étude des mécanismes conduisant au retard du développement pulmonaire chez le fœtus de ratte modérément diabétique apporte des éclaircissements sur la pathologie du fœtus humain de mère diabétique. Au contraire, le fœtus de ratte sévèrement diabétique, modèle le plus utilisé par les auteurs antérieurs, ressemble davantage à un adulte diabétique. Selon la sévérité du diabète, les anomalies pulmonaires relèvent donc de mécanismes différents.

Pour expliquer la diminution de biosynthèse du phosphatidylglycérol chez le fœtus de mère diabétique, on s'est demandé si l'augmentation du myo-inositol circulant entraînait une augmentation de synthèse du phosphatidyl-inositol et une diminution corrélative de synthèse du phosphatidylglycérol, les deux dérivant d'un précurseur commun. L'injection de doses croissantes de myo-inositol à la ratte gestante en fin de gestation a provoqué des diminutions proportionnelles du phosphatidylglycérol du poumon fœtal, allant jusqu'à sa suppression complète. L'augmentation du taux plasmatique de myo-inositol chez le fœtus de ratte sévèrement diabétique montre que la diminution de phosphatidylglycérol pulmonaire observée doit effectivement être la conséquence de ce mécanisme.

Enfin, la diminution d'un tiers de la concentration d'oxygène dans le sang de nouveau-nés dépourvus de phosphatidylglycérol pulmonaire, par rapport à des nouveau-nés normaux, montre que le phosphatidylglycérol doit jouer un rôle important dans la physiologie du surfactant.

PUBLICATIONS

B. PIGNOL, J. BOURBON et M. RIEUTORT, *Diminution du phosphatidylglycérol pulmonaire chez les fœtus de rattes rendues diabétiques par la streptozotocine (C.R. Acad. Sci., Paris, série III, 297, 339-342, 1983).*

J. BOURBON et P.M. FARRELL, *Fetal lung development in the diabetic pregnancy* (article de revue, *Pediat. Res.*, sous presse).

B. PIGNOL, M. RIEUTORT et J. BOURBON, *Diabète maternel et développement pulmonaire : utilisation de modèles de diabète de sévérité croissante pour la compréhension de mécanismes impliqués dans le retard de maturation* (*J. Physiol.*, résumé, 1984, sous presse).

III. *Comparaison du métabolisme de l'utérus gravide et du muscle, chez la lapine* (M. GILBERT, M. BOUISSET, M.C. PERE, en collaboration avec le laboratoire de F.C. BATTAGLIA, à Denver, Colorado, U.S.A.)

On a poursuivi des recherches destinées à préciser certains aspects du métabolisme maternel en fin de gestation chez la lapine. Les modifications métaboliques qu'entraîne la gestation doivent satisfaire à la demande métabolique des tissus maternels et permettre de diriger des quantités croissantes de substrats vers le fœtus afin d'assurer la croissance et le métabolisme oxydatif de ce dernier. Ces ajustements métaboliques ont été étudiés en mesurant l'utilisation de substrats par l'utérus gravide et par la masse musculaire.

Le travail est réalisé sur des animaux sur lesquels ont été implantés à demeure des cathéters qui permettent ultérieurement de faire des prélèvements sanguins sur l'animal éveillé et non traumatisé. En plaçant des cathéters dans l'artère fémorale et dans la veine utérine, on peut déterminer, jour après jour, la concentration d'un substrat dans le sang afférent et efférent de l'utérus (différence artério-veineuse pour le substrat considéré). La détermination du débit sanguin par la technique des microsphères radioactives permet alors de calculer la quantité de substrat utilisé par l'utérus gravide. A titre de comparaison on a étudié le métabolisme d'une masse musculaire (patte postérieure) des mêmes animaux. Le sang veineux est collecté à partir de la veine fémorale.

L'utérus est un site important d'utilisation de glucose. Entre 24 j et 30 j de gestation, la consommation de glucose de l'ensemble des deux cornes utérines (8 à 9 fœtus) augmente d'un facteur 3 à 4. A terme, environ 35 % du glucose produit par la mère, compte non tenu du glucose alimentaire, est dirigé vers l'utérus. Etant donné que la mère n'augmente pas sa production de glucose pendant la gestation, ceci suggère que les tissus maternels diminuent leur utilisation de glucose. Cette hypothèse est confirmée par la mesure des flux nets de glucose dans les muscles de la patte. En admettant que l'ensemble de la masse musculaire correspond à 45 % du poids du corps et qu'elle a la même activité métabolique que celle des muscles de la patte, on peut estimer la consommation de glucose par les muscles. Connaissant la production de glucose par l'organisme maternel, il apparaît que le reste est suffisant pour

satisfaire les besoins de l'utérus. L'augmentation de la consommation de glucose par l'utérus gravide est compensée par la diminution de la consommation des muscles.

La diminution de la consommation de glucose par les muscles de la patte entre 24 et 30 j n'est pas due à une chute de la glycémie et de l'insulinémie maternelle. Près du terme les muscles semblent moins sensibles à l'insuline. Une relative insensibilité des muscles à l'insuline en fin de gestation a déjà été observée dans d'autres espèces. Cette adaptation hormonale peut présenter un aspect intéressant. Si l'on provoque une hyperglycémie et une hyperinsulinémie chez la lapine gestante de 30 jours, le captage de glucose par les muscles de la patte n'est pas augmenté. On peut donc supposer qu'une élévation modérée et aiguë de la glycémie maternelle ne profite pas aux muscles mais vraisemblablement favorise l'utérus. A un stade moins avancé de la gestation, une hyperglycémie et une hyperinsulinémie provoquées augmentent la consommation de glucose par la patte d'environ 15 à 20 %.

Le dernier volet de ce travail a consisté à mettre au point une technique d'étude du métabolisme hépatique maternel en fin de gestation. On a placé à demeure un cathéter dans la veine porte et un autre dans l'artère fémorale pour la mesure des flux entrants de substrats. Un troisième cathéter dans une veine sus-hépatique permet la mesure des flux sortants de substrats. L'expérimentation est en cours.

PUBLICATIONS

M. GILBERT, S. HAUGUEL et M. BOUISSET, *Uterine blood flow and substrate uptake in conscious rabbit during late gestation* (*Am. J. Physiol.*, 1984, sous presse).

M. GILBERT, J.W. SPARKS et F.C. BATTAGLIA, *Effects of fasting on glucose turnover rate and metabolism levels in conscious pregnant guinea pigs* (*Biol. Neonate*, sous presse).

R.L. JOHNSON, M. GILBERT, G. MESCHIA et F.C. BATTAGLIA, *Cardiac output distribution and uteroplacental blood flow in the pregnant rabbit : a comparative study* (*Amer. J. Obstet. Gynecol.*, sous presse).

A. HELMAN, M. GILBERT, N. PFISTER-LEMAIRE, G. REACH et R. ASSAN, *Glucagon and insulin secretions, and their biological activities in hypothermic rats* (*J. Endocrinol.*, 1984, sous presse).

ACTIVITÉS DIVERSES

M. Alfred JOST a été nommé membre du Comité National d'Ethique en tant que représentant du Collège de France. Il a été invité comme Président d'Honneur du 7^e Congrès International d'Endocrinologie qui doit se tenir à Québec du 1^{er} au 7 juillet 1984. Il a organisé un Colloque de la Fondation Hugot du Collège de France intitulé : « Discussion sur les stades initiaux du Développement des gonades » (mai 1984) ; ce colloque a réuni des spécialistes venus de divers pays. Il a participé, ainsi que M^{lle} Solange MAGRE, à la réunion du « Groupe européen d'étude de l'endocrinologie cellulaire et moléculaire du testicule » (l'Arbresle, avril 1984).

M^{lle} Isabelle CHARTRAIN a passé l'année dans le laboratoire du D^r Elisabeth HAY à Boston (Mass., U.S.A.).

M. Michel RIEUTORT a fait un séjour d'un mois dans le laboratoire du Professeur P.M. FARRELL à Madison (Wisconsin, U.S.A.). Il a été invité à donner une conférence à l'« Academia Real de Farmacia » à Madrid. Il continue à faire partie du Jury de l'Agrégation des Sciences Naturelles pour 1984.

M^{me} Bernadette PIGNOL et M. Michel RIEUTORT ont présenté leurs recherches à la réunion de l'Association des Physiologistes à Louvain (mai 1984).

CHERCHEURS ÉTRANGERS

Le D^r Roxane AGELOPOULOU, « Lecteur permanent » en Histologie et Embryologie à l'Université d'Athènes, a poursuivi son travail au Laboratoire.

M^{lle} Evangélie PATSAVOUDI, d'Athènes, a préparé une thèse de 3^e Cycle.

Le Professeur Philip M. FARRELL, du Département de Pédiatrie, Université du Wisconsin à Madison (U.S.A.), a effectué un séjour sabbatique de 5 mois au laboratoire.

THÈSES

Quatre thèses de Doctorat de Spécialité (3^e Cycle) ont été soutenues devant l'Université Pierre et Marie Curie.

Isabelle CHARTRAIN : *Données sur la purification et la caractérisation d'un facteur sérique qui perturbe la morphogénèse testiculaire du fœtus de rat, in vitro* (5 juillet 1983).

Bernadette PIGNOL : *Effets de l'hyperinsulinémie chronique et du diabète maternel sur la maturation biochimique et morphologique du poumon du fœtus de rat* (19 juin 1984).

Evangélie PATSAVOUDI : *Différenciation des cellules de Leydig in vitro chez le fœtus de rat, en l'absence d'organogénèse testiculaire* (25 juin 1984).

Michèle BOUISSET : *Comparaison du métabolisme de l'utérus gravide et des muscles de la patte postérieure chez la lapine en fin de gestation* (25 juin 1984).