

## Physiologie du développement

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

Dans le cadre d'une enquête intitulée « *Différenciation cellulaire et relations fonctionnelles entre cellules dans les glandes génitales* », le cours de cette année a été consacré au testicule. Le testicule est un organe complexe dans lequel se différencient les spermatozoïdes, à partir de cellules d'apparence banale, les spermatogonies, alors que d'autres cellules voisines, les cellules interstitielles ou cellules de Leydig, synthétisent et sécrètent des hormones stéroïdes, spécialement la testostérone. La transformation si extraordinaire des spermatogonies en spermatozoïdes se fait au contact des cellules de Sertoli, dans les tubes séminifères. Les phases finales de la spermatogenèse requièrent l'action sur le testicule d'une hormone anté-hypophysaire, l'hormone folliculo-stimulante FSH, et de la testostérone. La nécessité de la testostérone, produite par les cellules interstitielles, pour la transformation spermatogénétique des cellules germinales dans les tubes avait montré l'influence d'un type cellulaire sur l'autre, voisin, dans le testicule. Or depuis 1978 un grand nombre de recherches est venu montrer que les divers types cellulaires constituant l'organe exercent les uns sur les autres des influences nombreuses et que ces interactions sont indispensables à la bonne marche de l'ensemble.

Les progrès techniques ont naturellement joué un grand rôle dans le progrès des connaissances. L'apport de la microscopie électronique avec ses possibilités de plus en plus fines a été considérable. Dès 1969-1970 Setchell d'une part, et Fawcett, d'autre part, avec leurs collaborateurs, ont mis en évidence des jonctions particulières entre les cellules de Sertoli, qui interdisent le passage entre les cellules depuis l'extérieur du tube séminifère jusqu'à sa lumière. Les spermatogonies résident à l'extérieur de cette barrière, dans le compartiment dit « basal ». C'est après avoir traversé cette barrière grâce à des remaniements complexes et pénétré vers l'intérieur du tube séminifère (compartiment « adluminal »), que les spermatocytes subissent la réduction chromatique, dans un milieu intra-tubulaire particulier. Les cellules

haploïdes sont séparées du reste de l'organisme par la barrière des cellules de Sertoli. Selon Setchell (1980) c'est la raison pour laquelle elles ne font pas apparaître les anticorps anti-sperme, que suscite un contact direct avec le reste de l'organisme ; ce dernier, en effet, ne reconnaît pas les cellules haploïdes comme lui appartenant et peut être immunisé contre ses propres spermatozoïdes.

Sans mentionner les méthodes de dosage de plus en plus fines, un autre progrès technique a conditionné une meilleure compréhension des interactions cellulaires, la séparation devenue plus efficace des divers types cellulaires composant l'organe et la culture de ces cellules *in vitro*. Ces techniques réductionnistes dépendent naturellement largement des observations faites *in vivo*. On résumera rapidement certaines des observations relatives aux interactions entre les divers types cellulaires du testicule.

\*  
\*\*

Un premier ensemble de faits concerne les *relations entre tubes séminifères et particulièrement entre cellules de Sertoli et cellules de Leydig*. Une ère nouvelle de recherches sur les relations entre cellules de Sertoli et cellules de Leydig a été ouverte en 1978 par Aoki et Fawcett (Biol. Reprod., 19 : 144). Ces auteurs ont eu l'idée d'introduire, dans le testicule de rats *in vivo*, des petits implants libérant localement soit un anti-androgène (acétate de cyprotéron), soit des substances anti-spermatogènes. Ces agents suppriment la spermatogenèse dans les tubes voisins, mais non dans le reste du testicule. Or au voisinage des tubes lésés, les cellules interstitielles de Leydig sont très hypertrophiées et paraissent hyperactives. Les auteurs suggèrent que les tubes séminifères doivent influencer localement les cellules de Leydig. Ils pourraient normalement produire une substance diffusible inhibant l'activité des cellules interstitielles ; une fois lésés, les tubes ne libéreraient plus la substance inhibitrice. On pourrait aussi comprendre les faits si, dans le dernier cas, les tubes sécrétaient un facteur stimulant le développement des cellules de Leydig.

Or au même moment, de Kretser, avec ses collaborateurs à Melbourne, étudiaient sur le rat le retentissement de diverses lésions testiculaires, comme la stérilisation par irradiation prénatale par les rayons X, ou une déficience chronique en vitamine A. Ces traitements entraînent une augmentation de volume des cellules de Leydig et de leur noyau ; de plus, la testostéronémie des animaux est affaiblie et la teneur plasmatique en LH élevée. Ainsi les cellules de Leydig paraissent très actives, mais elles sécrètent peu de testostérone. A partir de 1979, l'équipe du même laboratoire analyse les effets de lésions des tubes séminifères, produites par la cryptorchidie ou la ligature des canaux efférents. Dans les deux cas, une hypertrophie des cellules de

Leydig s'accompagne d'une faible testostéronémie et d'une élévation de la teneur en LH du plasma. Lorsqu'on réalise une cryptorchidie ou une ligature unilatérales, affectant un seul testicule, les cellules de Leydig de ce testicule seulement sont hypertrophiées, alors que les teneurs en testostérone et en LH du plasma sont normales. Il y a donc des corrélations intratesticulaires régulant l'état des cellules de Leydig.

D'autres observations plaident dans le même sens se sont alors accumulées. Bergh (*Int. J. Androl.* 6 : 57, 1983) montre que les cellules interstitielles s'hypertrophient lorsqu'elles se trouvent au contact de tubes séminifères au stade VII ou VIII de Leblond et Clermont. A ce moment les tubes ont la teneur la plus forte en testostérone, et sont sur le point de libérer des spermatozoïdes mûrs. Grotjan et Heindel (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 383 : 456, 1982) utilisent des préparations de cellules de Leydig isolées, et dosent la production de testostérone : cette production est nettement plus élevée si les cellules sont incubées dans un milieu qui avait préalablement servi à cultiver des cellules de Leydig, comme si ces dernières avaient enrichi le milieu en un facteur stimulant l'activité sécrétrice des cellules de Leydig. Mais le même résultat est obtenu avec des milieux ayant contenu des fibroblastes ou des cellules embryonnaires ; il ne s'agit donc pas d'une action spécifique caractéristique uniquement des cellules de Sertoli. Tabone et collab. (*Cell Tissue Res.*, 237 : 357, 1984) emploient des préparations purifiées de cellules de Leydig et de cellules de Sertoli. Comme on le savait, FSH n'augmente pas la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig, et naturellement ne provoque pas une telle sécrétion par les cellules de Sertoli. Or si l'on cultive ensemble les deux types cellulaires, FSH accroît la stéroïdogénèse. Les cellules de Sertoli ont répondu à FSH et ont stimulé les cellules de Leydig.

A la suite d'une longue série de recherches relatives à l'action de LHRH (ou d'agonistes voisins), et après avoir constaté que le testicule produit un ou des facteurs voisins, Sharpe et Fraser (*Nature*, 287 : 642, 1980) se sont demandé si les cellules de Sertoli n'agissaient pas sur les cellules de Leydig en sécrétant ce peptide. Les recherches récentes de Sharpe et Cooper (*Mol. Cell. Endocr.*, 37 : 159, 1984) démontrant l'intense activité stimulante du liquide interstitiel du testicule sur des cellules de Leydig en incubation, devraient permettre bientôt l'isolement d'une ou de substance(s) intéressante(s).

On peut, semble-t-il, rapprocher des faits précédents les observations relatives à différentes anomalies testiculaires d'origine génétique. Chez les rats Ps (pseudo-hermaphrodites) de Stanley et Gumbreck et chez les souris Tfm (Testicular feminization) de Lyon et Hawkes, présentant une insensibilité aux androgènes, les testicules sont cryptorchides et l'habitus externe est féminin. Or ces animaux ont des cellules de Leydig hypertrophiées, montrant une

activité enzymatique augmentée, alors que la testostéronémie est faible. Ce déficit s'explique par un défaut d'activité de la 17  $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase, acquis au cours du développement postnatal. Les sujets humains atteints de « féminisation testiculaire » ne présentent pas de déficit en testostérone ; l'état de leurs cellules de Leydig n'a pas encore fait l'objet de détermination quantitative précise. Il en est de même pour le testicule des hommes XX, qui, selon certains auteurs, auraient des cellules de Leydig « hyperplastiques » et une testostéronémie faible.

\*  
\*\*

*Les cellules myoïdes ou pérítubulaires* sont en contact d'un côté avec les cellules interstitielles et de l'autre avec les cellules de Sertoli. Ces cellules faiblement contractiles habitent la paroi des tubes séminifères dont la structure varie selon les espèces. Un ensemble d'observations expérimentales ou cliniques suggère que les cellules myoïdes dépendent de l'hormone mâle pour leur développement et leur fonctionnement, en particulier pour la formation et l'organisation des membranes basales et de la matrice extracellulaire.

Par ailleurs, des cellules de Sertoli de rat, isolées en culture, produisent davantage d'ABP (androgen binding protein) si l'on ajoute des cellules myoïdes dans le même milieu. Poursuivant ces recherches, Skinner et Fritz (P.N.A.S., 88 : 114, 1985) montrent que les cellules myoïdes secrètent, sous contrôle androgène, une protéine modulant les fonctions des cellules de Sertoli. Elles coopèrent aussi avec les cellules de Sertoli dans la formation des membranes basales, et influencent la structure même des cellules de Sertoli.

Les cellules pérítubulaires semblent donc jouer dans la physiologie du testicule un rôle bien plus grand que celui qui leur était attribué jusqu'ici.

\*  
\*\*

*Les relations entre cellules de Sertoli et cellules germinales* constituent certainement la clef de voûte de la spermatogenèse. La réduction chromatique des spermatocytes, suivie par le spermiogenèse ont lieu au contact intime des cellules de Sertoli. Or la spermatogenèse dépend d'un contrôle hormonal qui fait intervenir FSH et la testostérone et seules les cellules de Sertoli possèdent des récepteurs à ces hormones et non les cellules germinales. De plus, *in vivo* ou *in vitro*, ces deux hormones ont une action directe sur les cellules de Sertoli, telle que, par exemple, l'augmentation de l'ADN ou de l'ARN. On citera aussi l'observation suivante. Des souris chimères mâles, résultant de la fusion de morulas de souris normales et

de morulas de souris portant le gène Tfm d'insensibilité aux androgènes, peuvent dans un petit nombre de cas transmettre le gène Tfm par leurs spermatozoïdes. Cette observation s'interprète facilement si les androgènes nécessaires à la spermatogenèse agissent sur des cellules de Sertoli normales, au contact desquelles évoluent les cellules germinales portant le gène Tfm (M. Lyon et collab., 1975).

Les études faites pour explorer les relations entre cellules de Sertoli et cellules germinales sont nombreuses ; on en donnera une idée en rappelant un certain nombre des voies d'approche, sans rapporter le détail.

Les recherches de M. Parvinen (Endocrinol. Rev., 1982) mettent en évidence un cycle fonctionnel des cellules de Sertoli, parallèle au cycle de la spermatogenèse. Grâce à des prouesses techniques, cet auteur a réussi à identifier et à isoler des segments de tubes séminifères de rat à chacun des 14 stades définis par Leblond et Clermont. Les récepteurs à FSH sont les plus nombreux aux stades XIII à V, qui semblent correspondre aux stades d'action la plus forte de cette hormone ; la testostérone est cruciale aux stades VII et VIII, qui précèdent la libération des spermatozoïdes.

L'activité sécrétrice des cellules de Sertoli ainsi que son contrôle hormonal éventuel ont été étudiés *in vitro*. On a identifié plus d'une douzaine de substances parmi ces sécrétions. La production des unes dépend d'un contrôle hormonal par FSH (par exemple ABP, « plasminogen activator », transferrine, divers polypeptides), alors que cette dépendance n'existe probablement pas pour d'autres (ceruloplasmine, myoinositol, inhibiteur Müllérien). Parmi ces sécrétions, certaines servent de substrats métaboliques pour les cellules germinales et ont donc une importance particulière, tout spécialement le lactate et le pyruvate. Depuis 1981, des chercheurs de l'Université de Rotterdam (Jutte, Rommerts, Van der Molen et collab.), de la Worcester Foundation et de l'Université de Tokyo ont analysé les besoins des cellules germinales aux divers stades de leur évolution spermatogénétique, ainsi que l'aptitude des cellules de Sertoli à les couvrir. On a également examiné l'influence de la température sur certains métabolismes des cellules germinales. Toutes ces recherches ont ouvert des voies nouvelles et passionnantes dans l'étude de la spermatogenèse.

*In vitro*, des cultures purifiées de cellules de Sertoli peuvent exercer leur action sur des préparations de cellules de la lignée spermatogénétique. Ainsi Rivarola, Sanchez et Saez (travail sous presse) observent une augmentation de la synthèse de RNA et de DNA dans des populations de cellules germinales isolées du testicule de jeunes rats, à condition de les cultiver sur une monocouche de cellules de Sertoli. Tres et Kierszenbaum (P.N.A.S., 80 : 1983) obtiennent la progression de la prophase méiotique dans des spermatocytes *in vitro* à condition qu'ils soient en contact avec des cellules de

Sertoli. Les modalités de l'influence des cellules de Sertoli sur les cellules germinales *in vitro* restent à préciser.

Enfin, à l'inverse, les cellules germinales pourraient influencer la différenciation ou le fonctionnement des cellules de Sertoli. Les premières données de 1976 à 1979, relatives à des rats privés de cellules germinales à la suite d'un traitement prénatal par le busulfan ou à des souris, portant des gènes *W* ou *at* avaient donné une réponse négative en ce qui concerne la différenciation des cellules de Sertoli. Mais des recherches récentes donnent à penser que des cellules germinales isolées *in vitro* pourraient activer l'adénylate cyclase des cellules de Sertoli (Welsh et Treisman, 1983) ou augmenter leur production d'ABP (M<sup>m</sup> Le Gac et collab., 1984). Dans ce dernier cas, d'autres cellules que les cellules germinales exercent, semble-t-il, le même effet sur les cellules de Sertoli et il sera du plus haut intérêt de connaître le mécanisme de ces actions.

\*

\*\*

Le testicule contient des *facteurs inhibant ou stimulant les multiplications cellulaires*. Ainsi des extraits aqueux de testicule de rat exercent une activité inhibitrice sur la multiplication des spermatocytes A. L'existence de cette « chalone spermatogoniale » décrite d'abord par Clermont et Mauger (Cell Tissue Kinet., 1974, 1976) a été confirmée depuis. Il pourrait s'agir d'un facteur produit par les spermatogonies déjà entrées en division, régulant l'entrée de nouvelles spermatogonies dans le cycle spermatogénétique.

A l'inverse, on a extrait du testicule de rat un facteur de multiplication cellulaire (Seminiferous growth factor de Feig et Bellvé, cf. Rec. Progr. Horm. Res., 1984), sans doute produit par les cellules de Sertoli, et dont le rôle exact dans la physiologie du testicule reste à préciser.

Il est évident que l'entrée de certaines spermatogonies dans le cycle spermatogénétique et le moment de chaque mitose ou de la méiose étant régulés d'une manière extrêmement précise, on doit s'attendre à découvrir des facteurs de régulation. Les études actuelles n'en sont encore qu'à leurs débuts.

\*

\*\*

La dernière partie du cours a été consacrée à certains aspects de la *différenciation des divers types cellulaires du testicule* au cours du développement.

On ne retiendra ici que deux sortes de faits. On sait depuis longtemps (Clermont et Perey, 1957) que le nombre des cellules de Sertoli présentes dans le testicule de rat cesse d'augmenter vers la fin de la deuxième semaine

de vie postnatale et reste ensuite plus ou moins constant. On vient de montrer que la phase de multiplication la plus active (Orth, 1982) et le maximum du nombre de récepteurs à FSH (Warren et collab., 1984) sont trouvés durant les deux jours précédant la naissance et que durant cette période FSH produite par l'hypophyse fœtale est l'un des facteurs de cette prolifération (voir Orth, *Endocrinology*, 115 : 1248, 1984).

A un stade plus précoce du développement les cellules de Sertoli jouent un rôle de premier plan dans le développement du testicule. Nos recherches sur le testicule de fœtus de rat, avaient montré, dès 1972, que le premier signe morphologiquement décelable de différenciation testiculaire à partir de la gonade indifférenciée, est l'apparition des premières cellules de Sertoli. Ces cellules vont peu à peu s'accoler les unes aux autres et constituer de cette manière les premiers cordons séminifères. Or, *in vitro*, on peut empêcher l'agrégation de ces cellules — par exemple sous l'influence de sérum ajouté au milieu de culture dans lesquelles se développent les gonades. Les cellules de Sertoli se différencient malgré l'absence de morphogénèse testiculaire et sécrètent l'hormone inhibitrice des canaux de Müller (Magre et Jost, P.N.A.S., 1984). Les mêmes gonades différencient aussi des cellules de Leydig et sécrètent de la testostérone dans le milieu. Les deux types de cellules endocrines du testicule fœtal peuvent donc se différencier indépendamment de l'organogénèse des cordons séminifères. Mais les gonades de fœtus mâles empêchées d'acquiescer la structure testiculaire sous l'influence du sérum, produisent moins de testostérone, que celles formant des cordons testiculaires. Elles contiennent cependant, au moins autant sinon plus de cellules de Leydig (Patsavoudi et coll., *J. Endocrinol.*, 105 : 235, 1985). Cette observation conduit à se demander s'il existe dès les stades précoces du développement testiculaire des interactions entre cellules de Sertoli et cellules de Leydig, comme celles mises en évidence chez l'adulte.

L'ensemble des observations récentes sur le développement du testicule ouvre de nouvelles perspectives dans l'analyse de la différenciation des divers types cellulaires, en particulier des cellules endocrines, et dans celle de l'organogénèse testiculaire caractéristique. Ces processus peuvent être dissociés et obéissent sans doute à des mécanismes de contrôle différents qui devront être élucidés.

A. J.

#### SÉMINAIRES

Les séminaires ont comporté la discussion de problèmes de différenciation cellulaire et de relations entre cellules.

M<sup>me</sup> C. GUILLOUZO (INSERM U 49, Rennes)

— *Influence des cellules épithéliales biliaires sur les hépatocytes de rat in vitro.*

M<sup>me</sup> Y. LE GAC (Lab. de Physiologie des Poissons, I.N.R.A., Rennes)

— *Influence des cellules germinales sur les cellules de Sertoli du rat.*

MM. François GROS, V. MOULY et Ch. PINSET (Collège de France et Institut Pasteur)

— *Aspects biochimiques de la différenciation de la cellule musculaire.*

M. R. FERRAND (Faculté des Sciences, Nantes)

— *Différenciation autonome de l'antéhypophyse (Oiseaux, Mammifères).*

M<sup>me</sup> M. BEGEOT (Faculté de Médecine, Lyon Sud)

— *Cytodifférenciation des types cellulaires de l'antéhypophyse.*

M. J.V. RUCH (Institut de Biologie médicale, Strasbourg)

— *Rôle de la matrice extracellulaire dans la différenciation des odontoblastes.*

M. Ph. SENDEL (Université scientifique et médicale, Grenoble)

— *Rôle de la matrice extracellulaire dans les interactions dermo-épidermiques.*

#### TRAVAUX DU LABORATOIRE

##### I. *Différenciation des glandes génitales*

a) *Différenciation du testicule fœtal* (R. AGELOPOULOU, A. JOST, O. LOCQUET, S. MAGRE, S. PERLMAN et O. VALENTINO, en collaboration avec M. CASTANIER et R. SCHOLLER pour l'étude des stéroïdes).

L'analyse expérimentale de la différenciation du testicule fœtal du rat a été poursuivie et approfondie en utilisant le système *in vitro* antérieurement décrit. On sait que l'organogenèse testiculaire peut être obtenue à partir de gonades indifférenciées cultivées dans un milieu synthétique an hormonal, mais que cette organogenèse est empêchée si du sérum est additionné au milieu de culture. Dans les gonades qui se développent dans ces conditions, les cellules de Sertoli se différencient et sécrètent le facteur inhibiteur des canaux de Müller mais ne subissent pas d'agrégation en cordons (Magre et Jost, 1984). De plus dans ces gonades se différencient des cellules de Leydig qui sécrètent de la testostérone, bien que l'organogenèse testiculaire

n'ait pas eu lieu (Patsavoudi et coll., 1985). Ces expériences permettent donc de dissocier expérimentalement la différenciation des cellules endocrines du testicule de l'organogenèse des cordons séminifères.

Par ailleurs on a poursuivi et rapporté l'analyse du développement du testicule fœtal chez le lapin. L'apparition puis l'agrégation des cellules de Sertoli en cordons séminifères se réalise en 24 heures, entre 14 et 15 jours après le rapprochement sexuel ; en même temps les cellules situées entre ces cordons s'organisent en travées compactes au contact des cordons séminifères (Jost et Magre, 1984 ; Jost et al., 1985).

Dans le développement des cordons épithéliaux que constituent les cordons séminifères, des relations de type épithélio-mésenchymateux semblent jouer un rôle important. La matrice extracellulaire pourrait être importante (cf. cours 1982-1983). Une première indication en faveur de cette conception est l'absence de formation de la membrane basale dans les testicules développés en présence de sérum (Magre, 1985) et sa destruction lorsque des testicules de 15 jours, qui viennent de constituer une telle membrane, sont cultivés en présence de sérum (Agelopoulou et al., 1984).

Pour analyser les mécanismes en cause deux méthodes d'approche ont été utilisées, l'inhibition de la synthèse de la matrice extracellulaire et la mise en évidence de certains constituants de celle-ci dans diverses conditions expérimentales, par une technique immuno-histochimique. Ainsi, un compétiteur de la proline l'acide L-azétidine-2 carboxylique (LACA), connu pour perturber la synthèse du collagène, empêche la différenciation testiculaire *in vitro*, ou la détruit quand elle vient de se réaliser (Jost et al., 1985). Sous l'influence du LACA les cellules de Sertoli apparaissent, mais l'organogenèse des cordons séminifères est supprimée.

L'analyse détaillée de l'expression de la laminine (constituant en relation avec l'activité des cellules épithéliales) et de la fibronectine (en relation avec les cellules de type mésenchymateux) dans les gonades en développement est en cours. La comparaison des gonades mâles, développées *in vivo*, avec celles qui se différencient *in vitro*, soit dans le milieu synthétique de base, soit en présence de sérum ou de LACA, a déjà fait apparaître des faits intéressants : par exemple, les deux constituants étudiés ne s'expriment pas de la même manière dans les deux types de gonades sans cordons.

Enfin, on a entrepris un travail sur le testicule du fœtus de souris, destiné à permettre une comparaison avec le rat, en particulier pour ce qui est de l'étude expérimentale.

PUBLICATIONS

A. JOST et S. MAGRE, *Testicular development phases and dual hormonal control of sexual organogenesis* (In : « Sexual Differentiation : Basic and Clinical Aspects », M. Serio et al., eds. Raven Press, New York, pp. 1-15, 1984).

R. AGELOPOULOU, S. MAGRE, E. PATSAVOUDI et A. JOST, *Initial phases of testicular differentiation in vitro* (J. Embryol. exper. Morphol., 83, 15-31, 1984).

A. JOST, E. PATSAVOUDI, S. MAGRE, M. CASTANIER et R. SCHOLLER, *Relations entre organogenèse testiculaire et sécrétion de testostérone par le testicule fœtal in vitro* (Pathologie, Biologie, 32, 860-862, 1984).

S. MAGRE, E. PATSAVOUDI, A. JOST, M. CASTANIER et R. SCHOLLER, *Dissociation entre organogenèse et différenciation endocrine du testicule in vitro* (Colloque INSERM, 123, 407-412, 1984).

S. MAGRE et A. JOST, *Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7831-7834, 1984).

I. CHARTRAIN, S. MAGRE, M. MAINGOURD et A. JOST, *Effect of serum on organogenesis of the rat testis in vitro* (In Vitro, 20, 912-922, 1984).

E. PATSAVOUDI, S. MAGRE, M. CASTANIER, R. SCHOLLER et A. JOST, *Dissociation between testis morphogenesis and functional differentiation of Leydig cells* (J. Endocrinol., London, 105, 235-238, 1985).

A. JOST, S. MAGRE et E. PATSAVOUDI, *Morphogenesis and endocrine cytodifferentiation of the fetal testis* (VI Workshop on Development and Function of the reproductive Organs, Israël 22-24 octobre 1984, Serono Symposia, sous presse).

A. JOST, O. VALENTINO, R. AGELOPOULOU et S. MAGRE, *Action d'un analogue de la proline (acide L-azétidine-2-carboxylique sur la différenciation in vitro du testicule fœtal de rat* (C.R. Acad. Sci., Paris, série III, 301 : 225-232, 1985).

A. JOST, *Initial stages of gonadal development : theories and methods* (Arch. Anat. micro. Morphol. exp., 1985, sous presse).

A. JOST, *Organogenesis and endocrine cytodifferentiation of the testis* (Arch. Anat. micro. Morphol. exp., 1985, sous presse).

A. JOST, S. PERLMAN et S. MAGRE, *The initial stages of testicular differentiation in the rabbit fetus* (Arch. Anat. micro. Morphol. exp., 1985, sous presse).

S. MAGRE, *Différenciation des cellules de Sertoli et morphogénèse testiculaire chez le fœtus de Rat* (Arch. Anat. micro. Morphol. exp., 1985, sous presse).

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

On a poursuivi les recherches entreprises depuis plusieurs années et destinées à élucider les mécanismes responsables de l'évolution du nombre des cellules germinales dans les ovaires de fœtus de Rat.

On a également étudié *in vitro* l'influence du testicule de fœtus ou de nouveau-nés sur les cellules germinales de l'ovaire fœtal. Ces recherches sont inspirées par le cas des freemartins (cf. PREPIN, 1985). Le test utilisé est constitué par des ovaires de fœtus de Rat explantés à 13,5 jours et cultivés *in vitro* pendant 4 jours. Dans ces ovaires le nombre des cellules germinales est multiplié par 6 en moyenne (PREPIN et al., 1985a). Cette augmentation est trois fois plus faible si les ovaires se développent *in vitro* dans des milieux dans lesquels on avait préalablement cultivé pendant 4 jours des testicules (PREPIN et al., 1985b). Tout se passe comme si les testicules avaient libéré dans le milieu une ou des substances agissant sur les ovaires. Or l'action de ces milieux persiste s'ils sont dialysés contre du milieu neuf. Ils doivent donc contenir une (ou plusieurs) substances de poids moléculaire supérieur au seuil de rétention des membranes utilisées (50 000 daltons). L'action testiculaire semble s'exercer surtout durant la dernière phase de multiplication des cellules germinales. Des essais d'isolement de ce (ou ces) facteur(s) sont en cours.

D'autres recherches en cours ont pour objet de préciser la période du développement pendant laquelle le testicule produit la (ou les) substance(s) responsable(s) des effets observés ou d'analyser les effets d'un traitement prolongé de l'ovaire par les substances en question.

#### PUBLICATIONS

J. PREPIN, C. GIBELLO-KERVAN, G. CHARPENTIER et A. JOST, *Number of germ cells and meiotic prophase stages in fetal rat ovaries cultured in vitro* (J. Reprod. Fert., 73, 579-583, 1985a).

J. PREPIN, G. CHARPENTIER et A. JOST, *Action du testicule fœtal sur le nombre des cellules germinales de l'ovaire de fœtus de Rat, in vitro* (C.R. Acad. Sci., Paris, Série III, 300, 43-47, 1985b).

J. PREPIN, *Remarques sur la biologie des cellules germinales de l'ovaire fœtal (Rat, freemartins bovins)* (Arch. Anat. micro Morphol. exp., 1985, sous presse).

II. *Développement du poumon fœtal* (J. BOURBON, E. DOUCET, C. LINARD, B. PIGNOL et M. RIEUTORT en collaboration avec M<sup>mes</sup> N. GUETTARI, L. MARIN, C. TORDET et M. J.-P. RELIER, INSERM U 29, et MM. P.M. FARRELL et M. ENGLE, Université du Wisconsin, MADISON, WI, USA et M. A. JOBE, UCLA, TORRANCE, CA, USA).

Les travaux sur le développement pulmonaire ont porté sur quatre aspects résumés ci-dessous :

1) *Rôle du glycogène dans la maturation pulmonaire.* Les recherches antérieures de Jacques BOURBON avaient montré que la glycogénolyse qui se produit dans l'épithélium du poumon fœtal, en fin de gestation, dépend de deux enzymes : la phosphorylase et l'amyloglucosidase. Or les laboratoires Bayer ont récemment synthétisé un pseudosaccharide, l'ascarbose, qui inhibe spécifiquement l'amyloglucosidase et reproduit chez le rat adulte un syndrome semblable à la glycogénose de type II.

De l'ascarbose a été ajouté au milieu de culture (Waymouth) d'explants de poumon fœtal et, en 48 h, a inhibé la glycogénolyse de 40 %. L'amyloglucosidase pourrait donc rendre compte d'environ 40 % de la glycogénolyse, le reste revenant à la phosphorylase. En même temps, la biosynthèse de la phosphatidylcholine saturée, le constituant le plus caractéristique du surfactant pulmonaire, a été diminuée dans les explants, ce qui confirme le lien entre disparition du glycogène et synthèse du surfactant.

2) *Développement du poumon du fœtus de mère diabétique.* Le diabète maternel humain est une cause de retard de maturation du poumon fœtal, entraînant des détresses respiratoires néonatales. Les recherches antérieures sur le rat, consistant à provoquer des diabètes maternels de sévérité graduée (cf. BOURBON et al., sous presse) ont été poursuivies.

Michel RIEUTORT et Philip FARRELL ont miniaturisé une technique permettant d'isoler une fraction sub-cellulaire enrichie en surfactant à partir de faibles quantités de tissu, par ultracentrifugation sur gradients discontinus de sucrose. Dans cette fraction, la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol sont diminués transitoirement, à 20 jours de gestation, chez les fœtus de rattes sévèrement ou modérément diabétiques.

La diminution du phosphatidylglycérol dans le poumon du fœtus de mère diabétique résulte d'une augmentation du myo-inositol circulant. Une corrélation linéaire inverse a été établie entre myo-inositol plasmatique et phosphatidylglycérol. L'administration de myo-inositol à la ratte gestante réduit de 60 % le phosphatidylglycérol dans le surfactant intra-alvéolaire et diminue la compliance pulmonaire (courbes pression-volume) du rat nouveau-né. Ce résultat souligne l'importance de la détection du phosphatidylglycérol dans le liquide amniotique, comme critère de maturité pulmonaire chez le fœtus humain.

Au cours d'un séjour dans le laboratoire du Professeur Alan JOBE, à Torrance, Bernadette PIGNOL a miniaturisé un système de mesure de la compliance pulmonaire chez le fœtus et le nouveau-né de rat. Les courbes pression/volume enregistrées au cours d'un cycle inflation/déflation du poumon présentent un profil d'hystérésis d'autant plus marquée que le poumon contient plus de surfactant fonctionnel. Le fœtus de mère diabétique se distingue par une augmentation de la pression d'ouverture des alvéoles et par une diminution du volume résiduel à la déflation.

3) *Rôle des corticostéroïdes fœtaux dans le développement pulmonaire.* Pour essayer de déterminer dans quelle mesure les corticostéroïdes endogènes agissent sur la maturation pulmonaire, un anti-glucocorticostéroïde actif au niveau des récepteurs hormonaux (Roussel-UCLAF 38-486) a été administré à la ratte entre 16 et 20 jours de gestation. La concentration du poumon fœtal en phosphatidylcholine saturée n'a pas été modifiée. Pourtant la drogue a exercé un effet anti-glucocorticostéroïde qui s'est traduit par une augmentation du taux de corticostérone plasmatique et par une diminution de 80 % du glycogène hépatique. Les corticostéroïdes endogènes ne semblent donc pas jouer un rôle important dans l'initiation de la maturation biochimique de l'épithélium respiratoire.

4) *Maturation de l'épithélium respiratoire in vitro.* Le but du travail en cours est d'obtenir la différenciation de cellules épithéliales isolées pour étudier *in vitro* les facteurs qui contrôlent leur maturation. On a d'abord recherché, parmi les milieux de culture habituels, les plus favorables à la maturation des pneumocytes II. Le critère est l'accumulation des phospholipides dans une fraction enrichie en surfactant (poumons de fœtus de rat de 19,5 jours cultivés 48 h). Les milieux les plus favorables sont le MEM de Eagle et sa modification de Dulbecco, le milieu de Waymouth, le CMRL 1066 et le NCTC 109. D'autres se sont révélés médiocres (RPMI 1640, 199, Ham F10 et F12).

La séparation de cellules pulmonaires viables et physiologiquement actives est obtenue à partir de poumons de fœtus de rat à l'aide de collagénase ou de trypsine. L'isolement des pneumocytes II sur éponges de collagène est

prometteur. De telles préparations incorporent activement des précurseurs marqués des phospholipides du surfactant, et pourront servir de modèle expérimental. Ainsi, alors que la signification physiologique de la présence dans le poumon de divers neuropeptides (VIP, substance P, bombésinlike peptide...) n'est pas connue, on projette d'étudier l'effet de ces neuropeptides sur les cultures de pneumocytes. Auparavant il apparaît utile de caractériser des récepteurs éventuels de certains de ces peptides sur des préparations membranaires obtenues à partir d'homogénats de poumons. L'étude est en cours.

#### PUBLICATIONS

J. BOURBON, B. PIGNOL et M. RIEUTORT, *Rat models of diabetic pregnancy for study of fetal lung maturation* (Diabetologia, 27, 259A, 1984).

J.R. BOURBON et P.M. FARRELL, *Fetal lung development in the diabetic pregnancy* (Pediat. Res., 19, 253-267, 1985).

J.R. BOURBON, B. PIGNOL, L. MARIN, M. RIEUTORT et C. TORDET, *Maturation of fetal rat lung in diabetic pregnancies of graduated severity* (Diabetes, 34, 734-743, 1985).

N. GUETTARI, L. MARIN, C. TORDET, M.-E. DUFOUR, M. RIEUTORT et J. BOURBON, *Effet d'un antigluco-corticostéroïde (RU38-486) sur la maturation biochimique du poumon du fœtus de rat* (C.R. Acad. Sci., Paris, Série III, sous presse).

M. RIEUTORT, B. PIGNOL, E. DOUCET, P.M. FARRELL et J. BOURBON, *Diabète maternel et maturation biochimique du poumon fœtal : composition en phospholipides d'une fraction subcellulaire enrichie en surfactant* (J. Physiologie, Paris, résumé, sous presse).

B. PIGNOL, E. DOUCET, J. BOURBON et M. RIEUTORT, *Adaptation au fœtus de rat de méthodes d'évaluation de la maturité fonctionnelle du poumon ; application au fœtus de mère diabétique* (J. Physiologie, Paris, résumé, sous presse).

J. BOURBON, E. DOUCET et M. RIEUTORT, *Inhibition simultanée de la glyco-génolyse et de la biosynthèse du surfactant par l'Acarbose dans le poumon du fœtus de rat* (J. Physiologie, Paris, résumé, sous presse).

E. DOUCET, J. BOURBON, M. RIEUTORT et C. TORDET, *Rôle du myo-inositol dans le retard de maturation biochimique du poumon fœtal dans les grossesses diabétiques* (J. Physiologie, Paris, résumé, sous presse).

III. *Métabolisme de gestation* (M. GILBERT et M.C. PERE en collaboration avec le laboratoire de F.C. BATTAGLIA à Denver, Colorado, USA).

a) *Métabolisme glucidique chez le cobaye en fin de gestation.* Chez le cobaye, la masse fœtale à terme (65 j.) peut représenter entre 10 % (1 fœtus) et 40 % (6 fœtus) du poids de la mère. Le but du travail a été de mesurer le renouvellement du glucose sanguin chez des femelles normalement nourries ou après un jeûne de 24 heures. On a perfusé, d'une manière continue, du glucose radioactif à des mères dont le nombre de fœtus était de 1, 2, 4, 5 ou 6 fœtus. Chez la femelle nourrie, la glycémie maternelle n'est pas affectée par la taille de la portée. Cette constance de la glycémie est due au fait que la mère augmente sa production de glucose au fur et à mesure que la masse fœtale augmente. Une femelle ayant 6 fœtus produit environ 1,5 fois plus de glucose qu'une femelle ayant un seul fœtus. Après un jeûne de 24 heures, la glycémie maternelle diminue d'une manière proportionnelle au nombre de fœtus (50 % pour une portée de 6 fœtus). La chute de la glycémie s'explique par une diminution de la production du glucose maternel, accompagnée d'une importante consommation par les fœtus. Le manque de substrats glucoformateurs (surtout lactate et alanine) semble être le facteur limitant de la production de glucose. Ce travail confirme chez le cobaye le résultat connu déjà chez le mouton soulignant le rôle de la masse fœtale dans le métabolisme glucidique de la femelle gestante.

b) *Métabolisme hépatique chez la lapine gestante.* Nos recherches antérieures ont montré qu'en fin de gestation l'utérus de la lapine utilise une quantité importante de glucose. Les muscles, eux, ont une consommation de glucose réduite par suite de la diminution de leur sensibilité à l'insuline. Il en résulte que davantage de glucose est dirigé vers l'utérus.

Le programme de cette année a porté sur le rôle du foie dans les réajustements métaboliques qui se mettent en place en fin de gestation. En particulier, la question de sa réponse à l'insuline a été posée. L'étude est réalisée en mesurant les flux de substrats à travers le foie. La technique consiste à placer 3 cathéters à demeure chez l'animal (veine porte, artère fémorale et veine sus-hépatique). Les substrats étudiés ont été les suivants : glucose, lactate, alanine et corps cétoniques. L'étude est réalisée chez des femelles gestantes de 24 j., et sur des femelles non gestantes.

Le protocole expérimental consiste à mettre les animaux à jeun pendant 18 h, puis à leur donner un repas, et à les étudier 1 heure après. Chez les animaux à jeun, il n'y a pas de différence dans les flux hépatiques des quatre substrats étudiés, que la femelle soit gestante ou non. Une heure après le repas, il n'y a pas de différence non plus entre femelles gestantes ou non en ce qui concerne les flux de lactate et d'alanine (diminution de l'utilisation) et la production des corps cétoniques (qui diminue); au contraire, pour ce

qui est du glucose, les femelles gestantes diffèrent des femelles non gestantes. Chez les femelles gestantes la production de glucose est moins diminuée. Il y a ainsi plus de glucose disponible en périphérie, en particulier pour l'utérus. Or la concentration en insuline et le rapport molaire insuline/glucagon dans le sang de la veine porte sont plus élevés chez la femelle gestante. On peut donc conclure à une relative insensibilité du foie à l'insuline, à ce stade de la gestation. Il faudra vérifier ce qui se passe à 30 jours de gestation, stade où les exigences métaboliques de l'utérus sont plus importantes.

#### PUBLICATIONS

M. GILBERT et M. BOUISSET, *Comparative study of uterine and muscle metabolism in conscious late pregnant rabbits* (Europ. J. Obstet. Gynaec. Reprod. Biol., 18, 71-75, 1984).

E. DELVIN, M. GILBERT et J.M. GAREL, *Placental transfer of 1,25-dihydroxycholecalciferol in the rabbit* (Calc. Tissue Int., 36, suppl. n° 2, 144A, 1984).

J. GIRARD, A. LETURQUE, A.F. BURNOL, P. FERRE et M. GILBERT, *Glucose homeostasis during pregnancy in the rat* (In : « Lessons from animal diabetes, E. Shafir et A.E. Renold, eds. J. Libbey Co, London, pp. 667-675, 1984).

L.L.H. PEETERS, L. MARTENSON, M. GILBERT et L. PENICAUD, *The pregnant guinea pig, rabbit and rat as unstressed catheterized models* (In : « Animal models in fetal medicine », P.W. Nathanielsz, ed. Perinatology Press, pp. 75-108, 1984).

M. GILBERT, J.W. SPARKS, J. GIRARD et F. BATTAGLIA, *Effects of fasting on glucose turnover rate and metabolite levels in conscious pregnant guinea pigs* (Biol. Neonate, 48, 90-99, 1985).

R. JOHNSON, M. GILBERT, S. BLOCK et F. BATTAGLIA, *Effects of fasting on uterine metabolism in conscious rabbits* (Biol. Neonate, sous presse).

#### ACTIVITÉS DIVERSES

M. Alfred Jost a été élu Associé étranger de la « National Academy of Sciences of the U.S.A. ». Il a participé, comme Président d'honneur, au VII<sup>e</sup> Congrès international d'Endocrinologie (Québec, 1-7 juillet 1984). Il a été invité au « VI Workshop on development and function of the reproductive

organs » au Weizmann Institute, à Rehovot (Israël). Il a pris part en même temps que M<sup>lle</sup> Solange MAGRE, Sous-Directeur du Laboratoire, à la réunion organisée par l'INSERM sur le chromosome Y et la détermination du sexe (Seillac, 23-27 septembre 1984).

Plusieurs chercheurs du Laboratoire ont participé activement à des réunions scientifiques : réunion de l'Association européenne pour l'étude du diabète, à Londres en septembre 1984 (J. BOURBON); réunions de l'Association des Physiologistes à Clermont-Ferrand, en avril 1985 (B. PIGNOL et M. RIEUTORT) et à Lille, en juin 1985 (J. BOURBON et E. DOUCET); 7<sup>e</sup> Colloque de la Société française de biologie du développement, à Marseille en mai 1985 (S. MAGRE).

M. GILBERT et M<sup>lle</sup> M.C. PERE ont fait chacun un séjour (6 et 3 mois respectivement) dans la Laboratoire du Professeur F.C. BATTAGLIA, à Denver (Colorado, USA). M<sup>me</sup> B. PIGNOL a fait un stage de 4 mois dans le Laboratoire du Professeur JOBE, UCLA, Los Angeles.

M. Michel RIERTORT fait partie du jury d'agrégation de Sciences naturelles pour la session de 1985.

#### CHERCHEURS ÉTRANGERS

Le Laboratoire a accueilli cette année :

— Le D<sup>r</sup> Roxane AGELOPOULOU, de l'Université d'Athènes, qui a poursuivi des recherches d'immuno-histochimie ;

— M. Nicolas SARLIS, d'Athènes, pour un séjour de 6 semaines ;

— M<sup>lle</sup> Naima HIDA, M'Barka MOUIZINA et M<sup>me</sup> Najia TAIB-HEMDAOUI, toutes trois de nationalité marocaine, pour un stage de DEA.