

## **Prolifération des cellules germinales foétales de mammifère, état en 1993**

Le mécanisme du contrôle de la prolifération des cellules germinales de mammifère reste mal connu, mais l'implication d'un axe hypophyso-surrénalo-thymique est certaine. La thymuline, un facteur thymique dont la production est inhibée par les glucocorticoïdes, est un activateur de la prolifération des cellules germinales. La FSH, une hormone hypophysaire, agit par l'intermédiaire des cellules de Sertoli sur le nombre des gonocytes. Ces cellules de Sertoli, ainsi que les cellules de la *granulosa* dans l'ovaire adulte, sécrètent l'activine, un activateur de la prolifération des spermatogonies chez le rat prépubère. À l'inverse, l'inhibine, appartenant comme l'activine à la famille du TGF  $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ), probablement sécrétée par les gonades foétales, peut inhiber la prolifération des cellules germinales. Les gonades foétales mâles sécrètent aussi des inhibiteurs de la multiplication des ovogonies. Une partie importante de la régulation du nombre des cellules germinales pourrait se faire par l'intermédiaire de cellules somatiques (cellules de Sertoli, cellules folliculaires), protégeant les gonocytes de la dégénérescence par apoptose.

---

Jacques Prépin

---

### ADRESSE

J. Prépin : maître de conférences à l'université Pierre-et-Marie-Curie, centre universitaire des Saints-Pères, laboratoire de cytologie et histologie, 75270 Paris Cedex 06, France.

L'histoire des cellules germinales des mammifères comporte une série de phases caractéristiques et interdépendantes : (1) migration depuis le pédoncule allantoïdien jusqu'au lieu de différenciation des gonades situé sur la face ventrale du mésonéphros ; (2) prolifération et/ou dégénérescence ; (3) entrée en méiose ; (4) maturation des gamètes. La prolifération est un des évé-

nements majeurs de la gamétogenèse car elle aboutit à la constitution d'un stock de cellules germinales dans les gonades foétales ou néonatales dont on peut raisonnablement penser qu'il conditionne en partie la fertilité de l'adulte. L'évolution du nombre des cellules germinales foétales mâles et femelles est bien connue ; en revanche, les mécanismes impliqués dans cette évolution demeurent obscurs du fait que l'expérimentation *in vivo* est limitée

par les contraintes anatomo-physiologiques de l'embryogenèse et de la gestation.

Des avancées récentes dans la connaissance en termes moléculaires des mécanismes qui contrôlent l'entrée en mitose viennent d'émerger. On sait maintenant que si des hormones, des facteurs de croissance ou des facteurs mitogènes étaient capables de modifier le cycle cellulaire des cellules germinales, ils agiraient finalement en activant ou en réprimant la protéine p34<sup>cdc2</sup>, régulateur universel de la phase M du cycle cellulaire et identifiée comme un composant du MPF (*M-Phase Promoting Factor*) ou bien encore en contrôlant les mécanismes de synthèse ou de dégradation des cyclines. En effet, la protéine p34<sup>cdc2</sup> induit la condensation des chromosomes, la mise en place d'un fuseau mitotique et la rupture de la membrane nucléaire, à la condition d'être déphosphorylée et associée à une cycline. Mais reste encore inconnue la chaîne de transmission des signaux, initiés par le facteur déclenchant ou inhibant les mitoses des cellules germinales fœtales (hormone, facteur de croissance...), situés en amont de l'activation (ou de l'inactivation) de la protéine p34<sup>cdc2</sup>.

L'évolution du nombre des cellules germinales fœtales résulte de plusieurs événements : mitoses, phase (s) de repos et vague (s) de dégénérescence qui peuvent exister simultanément (cas des gonocytes mâles) ; de plus, elle est différente selon le sexe. Nous prendrions comme exemple le cas du rat.

Chez le fœtus de rat, à 13 jours *post-coïtum* (pc), il y a environ 2 500 cellules germinales primordiales présentes dans les crêtes génitales et les autres tissus, puisque la migration des cellules germinales n'est pas terminée à cet âge.

Dans le testicule fœtal, le nombre des gonocytes est multiplié par 6 entre le 14<sup>e</sup> et le 18<sup>e</sup> jour de la gestation et le maximum est atteint au 20<sup>e</sup> jour pc où plus de 140 000 cellules sont alors dénombrées dans chaque testicule. Ce nombre reste stable jusqu'au 4<sup>e</sup> jour suivant la naissance [1]. Une vague de dégénérescence, probablement par apop-

tose [2], survient alors, affectant plus de 70 % des gonocytes. L'augmentation du nombre des cellules germinales, devenues spermatogonies, reprendra plus tard et se poursuivra jusqu'à la puberté.

Chez les femelles, le nombre des cellules germinales suit une évolution biphasique ; il augmente rapidement, passe par un maximum à 18 jours pc (environ 75 000 par ovaire) avant de décroître brutalement de 30 % par pycnose d'ovogonies et des ovocytes arrivés au stade zygotène [3] ; la prolifération des cellules germinales prend fin naturellement par l'entrée précoce en prophase méiotique.

Dans des suspensions cellulaires cultivées *in vitro* et enrichies à plus de 80 % en cellules germinales fœtales, celles-ci se divisent [4], suggérant que les cellules somatiques ne sont pas indispensables à la multiplication des cellules germinales. Cependant, jamais l'ensemble des phases de l'évolution naturelle (mitose, méiose, maturation...) n'a pu être obtenu par des cellules germinales fœtales cultivées *in vitro*.

Dans les gonades fœtales de rats mâles [5] et femelles [6] cultivées *in vitro*, le nombre des cellules germinales augmente. Chez les femelles, ce nombre s'accroît puis diminue selon un mode biphasique et une chronologie identiques à ceux observés *in vivo* [7]. Tout se passe donc comme si l'évolution du nombre des cellules germinales était programmée et ne nécessitait pas d'intervention extragonadique. Ainsi, si des facteurs devaient contrôler le nombre des cellules germinales fœtales, ce contrôle ne pourrait s'effectuer qu'en modifiant le programme de base de prolifération ou de dégénérescence.

### **Facteurs stimulateurs**

L'existence d'une régulation endocrine de la prolifération des cellules germinales fœtales *in utero* est établie (figure 1). En effet, les fœtus femelles de lapin décépités en guise d'hypophysectomie à 19 jours ont, 9 jours plus tard, un nombre d'ovogonies augmenté de 40 % par rapport aux témoins [8] (figure 2). L'interprétation d'un tel résultat n'est pas évi-

dente puisque les hormones anté-hypophysaires n'ont pas d'effets sur les cellules germinales fœtales. En fait, l'hypophyse agit indirectement : la décapitation prive le fœtus d'ACTH, ce qui diminue la production de corticostérogène par les surrénales, et lève ainsi l'inhibition que celles-ci exercent sur le thymus. Dans ces conditions, le thymus secrète davantage de thymuline, nonapeptide impliqué dans les phénomènes immunitaires, et qui s'est révélé, *in vitro*, un puissant stimulateur de la prolifération des cellules germinales dans les testicules [5] et les ovaires [6] de fœtus de rat. Son action, cependant, pose deux problèmes non élucidés : 1) la thymuline agit-elle sur les cellules germinales elles-mêmes ou bien sur les cellules somatiques qui, en réponse, stimuleraient les mitoses germinales ? 2) quelles sont les situations physiologiques susceptibles d'agir sur l'axe hypophyso-surrénalo-thymique pour faire augmenter ou diminuer la sécrétion de thymuline ? De plus, il semble que l'activité de la thymuline ne s'exerce pas de façon continue mais soit plutôt confinée à une courte période concomitante de la reprise de l'activité mitotique. L'axe hypophyso-surrénalo-thymique n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la stimulation de la multiplication des cellules germinales fœtales. Ainsi, un peptide appartenant à la superfamille des TGF (*Transforming Growth Factor*), l'activine, sécrétée par les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa des gonades adultes, constituée de deux sous-unités  $\beta$ , stimule *in vitro* la prolifération des spermatogonies dans les testicules de rats prépubères [9]. Elle stimule peut-être aussi la prolifération des cellules germinales fœtales, puisque des ARNm de sa sous-unité  $\beta$  ont été détectés dans les gonades des fœtus de rat, où elle est donc présente [10]. Son rôle éventuel chez le fœtus de rat n'a pas été recherché.

Des facteurs mitogènes ou des facteurs de croissance (*mitogenic factor...*), mis en évidence souvent sur la base de leur capacité à augmenter l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans des fibroblastes ou des cellules de Sertoli cultivés *in vitro*, ont été identifiés (ou isolés)

## RÉFÉRENCES

1. Beaumont HM, Mandl A. A quantitative study of primordial germ cells in the male rat. *J Embryol Exp Morphol* 1963; 11: 715-40.
2. Miething A. Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 1992; 267: 583-90.
3. Beaumont HM, Mandl A. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1962; 155: 557-9.
4. Wabik-Slitz B, McLaren A. Culture of mouse germ cells isolated from fetal gonads. *Exp Cell Res* 1984; 154: 530-6.
5. Prépin J. Le thymus fœtal et la thymuline stimulent la prolifération des gonocytes dans le testicule fœtal de rat *in vitro*. *C R Acad Sci Paris, [III]* 1993; 316: 451-4.
6. Prépin J. Le thymus fœtal et la thymuline stimulent la prolifération des ovogonies dans l'ovaire fœtal de rat *in vitro*. *C R Acad Sci Paris* 1991; 313: 407-11.
7. Prépin J, Gibello-Kervran C, Charpentier G, Jost A. Number of germ cells and meiotic prophase stages in fetal rat ovaries cultured *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1985; 73: 579-83.
8. Prépin J, Jost A. Augmentation du nombre des ovogonies dans l'ovaire de fœtus de lapin hypophysectomisé par décapitation. Rôle probable du thymus. *C R Acad Sci Paris* 1991; 313: 81-5.
9. Mather JP, Attie KM, Woodruff TK, Rice GC, Phillips DM. Activin stimulates spermatogonial proliferation in germ-Sertoli cell cocultures from immature rat testis. *Endocrinology* 1990; 127: 3206-14.
10. Roberts V, Vale W. Expression of inhibin / activin subunit messenger ribonucleic acids during rat embryogenesis. *Endocrinology* 1991; 128: 3122-9.
11. Ackland JF, Schwartz NB, Mayo KE, Dodson RE. Nonsteroidal signals originating in the gonads. *Physiol Rev* 1992; 72: 731-87.
12. Orr-Urtreger A, Avivi A, Zimmer Y, Givol D, Yarden Y, Lonai P. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development* 1990; 109: 911-23.
13. Motro B, van der Kooy D, Rossant J, Reith A, Bernstein A. Contiguous pattern of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci. *Development* 1991; 113: 1207-21.
14. Godin L, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. Effects of the steel gene product on primordial germ cell survival in culture. *Nature* 1991; 352: 809-11.
15. Orth JM, Gonsalus GI, Lamperti A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depend on numbers of Sertoli cells produced during prenatal development. *Endocrinology* 1988; 122: 787-94.

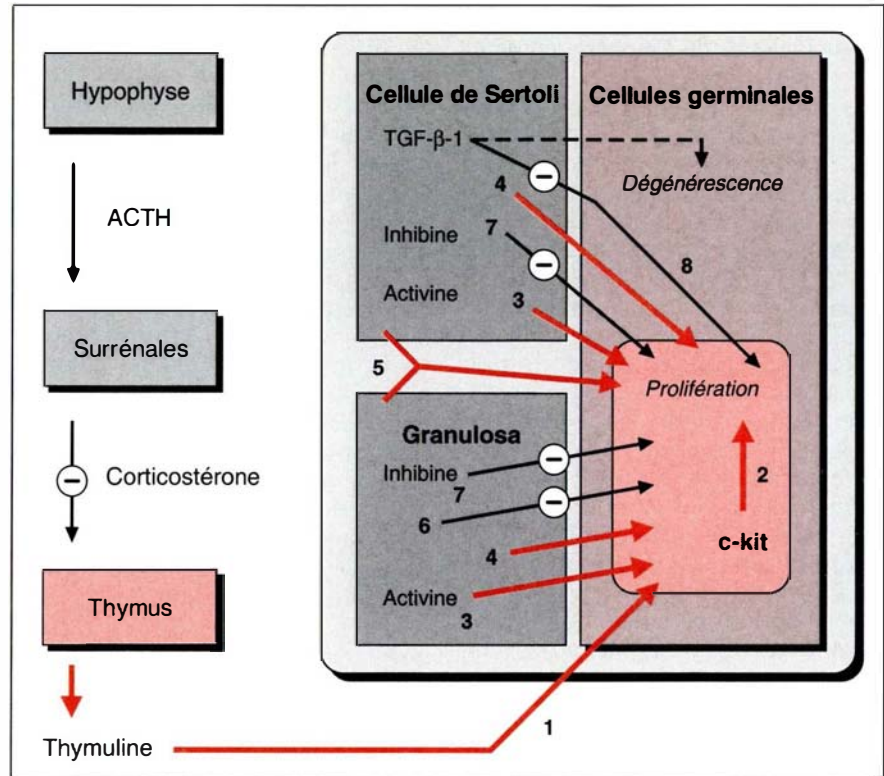


Figure 1. **Schéma des données et des hypothèses (indiquées par ?) relatives à la régulation par stimulation (flèches rouges) ou par inhibition (traits fins) de la prolifération ou par induction de la dégénérescence (trait discontinu) des cellules germinales fœtales. Stimulation :** 1. L'activité de l'axe hypophyséo-surrénalo-thymique aboutit à une sécrétion de thymuline qui stimule la prolifération des cellules germinales fœtales. 2. La protéine active du gène c-kit est nécessaire à la prolifération des cellules germinales fœtales (preuves chez la souris). 3. L'activine, présente dans les gonades fœtales (ARNm détectés), pourrait stimuler la prolifération des cellules germinales fœtales. (?) 4. Des facteurs mitogènes, présents dans les gonades d'animaux pubères ou non, mais non recherchés chez les fœtus. (?) 5. Intervention des cellules somatiques des ébauches gonadiques; leur nombre conditionnerait le nombre des cellules germinales fœtales. (?) **Inhibition :** 6. Chez les embryons femelles, le facteur germinostatique produit par les cellules folliculaires inhibe la prolifération des cellules germinales fœtales. 7. L'inhibine présente dans les gonades fœtales (ARNm détectés) pourrait inhiber la prolifération des cellules germinales fœtales. (?) 8. Le TGF-β1 inhibe *in vitro* la prolifération des cellules germinales fœtales de souris et pourrait induire leur dégénérescence. (?)

dans des cellules somatiques de gonades matures ou non [11]. Mais leur présence dans les gonades fœtales n'a pas été démontrée, pas plus d'ailleurs que leur capacité à stimuler la prolifération des cellules germinales fœtales.

Des ARNm de la protéine active c-Kit du gène dominant *White spotting* (W) ont été mis en évidence dans les cellules germinales de souris [12]. L'importance de cette protéine pour

la prolifération des cellules germinales primordiales est démontrée par la stérilité des souris mutantes homozygotes WW, due à une défaillance précoce du développement des cellules germinales primordiales [13, 14]. Les mécanismes contrôlant l'expression du gène W ne sont pas connus.

D'après certains auteurs, le nombre des cellules somatiques des gonades conditionnerait celui des cellules

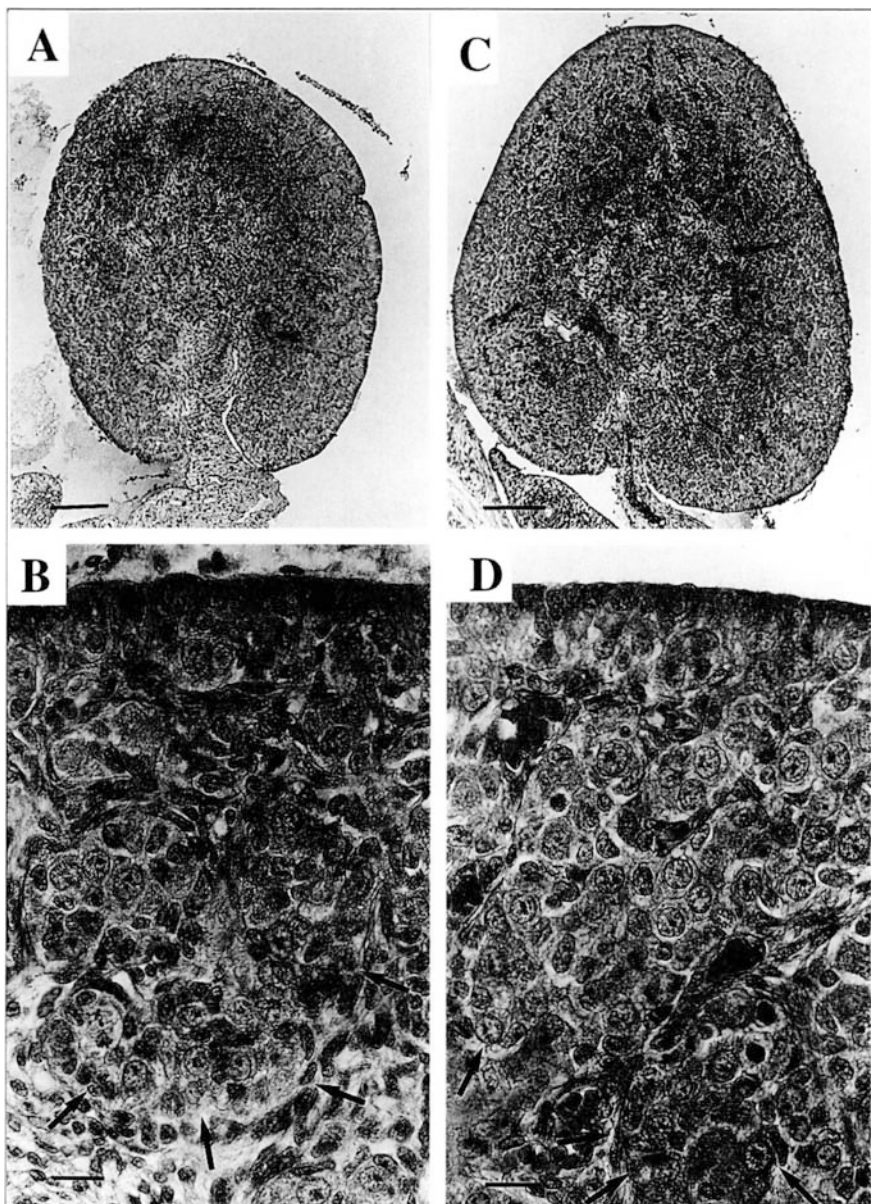


Figure 2. **Coupes histologiques d'ovaire foetal de lapin de la même portée.** En **A** et **B**, fœtus témoin de 28 jours post-coïtum (pc); en **C** et **D**, fœtus hypophysectomisé par décapitation à 19 jours pc et sacrifié à 28 jours pc. Le fœtus décapité a des ovaires plus volumineux, la zone des cordons ovigères, limitée par des flèches, est plus épaisse et les cellules germinales sont plus nombreuses. Barre = 100  $\mu$ m (**A** et **C**), 15  $\mu$ m (**B** et **D**).

germinales : le nombre des gonocytes serait proportionnel au nombre des cellules de Sertoli [15] et seuls les ovocytes entourés par les cellules folliculaires ne dégénéraient pas [16]; ainsi, leur survie ne dépendrait que du nombre des cellules somatiques présentes dans les cordons ovigères au cours de la folliculogénèse. Si cette relation cellule somatique/cellule germinale était confirmée, chez le fœtus mâle, à

côté d'un contrôle direct de la prolifération des cellules germinales par les cellules somatiques, il y aurait aussi un contrôle indirect, endocrine, (par la FSH ou *Follicle-Stimulating Hormone*) et paracrine (par la  $\beta$ -endorphine), du nombre des cellules germinales fœtales. En effet, une  $\beta$ -endorphine produite par les cellules de Leydig fœtales réduit la prolifération des cellules de Sertoli induite par la FSH [17].

### Facteurs inhibiteurs

L'existence de facteur(s) gonadique(s) capable(s) de prévenir la multiplication des ovogonies, voire de provoquer leur dégénérescence, est démontrée par l'exemple des *freemartins* de bovidés. Un *freemartin* est une femelle issue d'une gestation gémellaire qui a été reliée par des anastomoses vasculaires *in utero* à un ou plusieurs jumeaux mâles et qui, une fois adulte, est stérile. Cet état résulte d'un arrêt de la multiplication des cellules germinales, puis de leur dégénérescence, pendant la vie embryonnaire [18]. Le facteur responsable est issu des testicules du jumeau mâle [19]. Une substance délétère pour les cellules germinales fœtales femelles (facteur germinostatique) a été partiellement isolée et caractérisée à partir de milieux conditionnés par des testicules de fœtus ou de rat adulte [20, 21].

L'existence d'un facteur testiculaire, prévenant la multiplication des ovogonies et sans effet sur les cellules germinales mâles, ne présenterait qu'un intérêt limité au cas des *freemartins* si un facteur germinostatique n'était aussi sécrété par les ovaires de jeunes rattes impubères pourvues de follicules secondaires ovariens [22]. Ce facteur inhibe *in vitro* la prolifération des ovogonies dans les ébauches ovariennes fœtales. Chez le rat et d'autres espèces, à l'époque où les follicules se différencient, les ovogonies sont déjà toutes entrées en méiose, et le facteur germinostatique ne peut naturellement pas inhiber leur prolifération. En revanche, dans les espèces chez lesquelles les processus ovogénétiques sont plus lents, des ovogonies sont encore présentes dans les ovaires alors que des follicules sont déjà différenciés. Dans ces espèces, si un facteur germinostatique ovarien est produit, il peut inhiber la prolifération des ovogonies et induire leur disparition. Cette hypothèse est confortée par l'observation, chez le fœtus de veau, d'ovogonies qui dégénèrent à mi-gestation, sans évoluer plus avant [23].

Selon des données controversées, les spermatoocytes et les spermatoïdes ronds (cellules différenciées) de rat produisent des substances (chalones)

## RÉFÉRENCES

16. Ohno S, Smith JB. Role of follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. *Cytogenetics* 1964; 3: 324-33.
17. Orth JM. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by  $\beta$ -endorphin produced in the testis. *Endocrinology* 1986; 119: 1876-8.
18. Prépin J, Jost A, Vigier B. Les cellules germinales des freemartins. *Ann Med Vet* 1977; 121: 537-45.
19. Vigier B, Locatelli A, Prépin J, du Mesnil du Buisson F, Jost A. Les premières manifestations du « freemartinisme » chez le fœtus de veau ne dépendent pas du chimerisme chromosomique XX/XY. *C R Acad Sci Paris* 1976; 282: 1355-8.
20. Prépin J, Charpentier G, Jost A. Action du testicule fœtal sur le nombre des cellules germinales de l'ovaire de fœtus de rat, *in vitro*. *C R Acad Sci Paris* 1985; 300: 43-7.
21. Prépin J, Charpentier G, Hida N, Maingourd M. Isolement par liaison à des membranes d'ultrafiltration, d'un facteur testiculaire limitant le nombre des cellules germinales dans l'ovaire fœtal de rat *in vitro*. *C R Acad Sci Paris* 1986; 303: 123-6.
22. Prépin J, Hida N. Limitation du nombre des cellules germinales dans l'ovaire fœtal de rat par des ovaires plus âgés. *C R Acad Sci Paris* 1989; 108: 61-4.
23. Prépin J, Vigier B, Jost A. Meiosis in fetal freemartin gonads and in rat fetal ovaries *in vitro*. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1979; 19: 1263-71.
24. Sharpe RM. Local control of testicular function. *Q J Exp Physiol* 1983; 68: 265-87.
25. van Dissel Emiliani FM, Grootenhuis AJ, de Jong FH, de Rooij DG. Inhibin reduces spermatogonial numbers in testes of adult mice and chinese hamsters. *Endocrinology* 1989; 125: 1899-903.
26. Godin I, Wylie CC. TGF- $\beta$ 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 1991; 113: 1451-7.
27. Josso N. L'hormone anti-Müllerienne. *médecine/sciences* 1987; 3: 444-52.
28. Jost A. Les péripiéties d'une recherche : l'étude de la différenciation sexuelle. *médecine/sciences* 1991; 7: 263-75.
29. Taketo T, Saeeds J, Nishioto Y, Donahoe PK. Delay of testicular differentiation in the B6, Y (DOM) ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for mullerian inhibiting substance. *Dev Biol* 1991; 146: 386-95.
- capables d'inhiber la prolifération des spermatogonies (cellules, peu ou pas différenciées). Le stade à partir duquel ces substances sont produites n'est pas connu [24] et leur existence au stade fœtal semble peu probable. L'inhibine est vraisemblablement présente dans les gonades embryonnaires puisque des ARNm de ses deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  y ont été détectés [10]. L'inhibine, injectée dans des testicules de hamster ou de souris adultes, réduit le nombre des spermatogonies [26], mais son activité sur la prolifération des cellules germinales fœtales n'a pas été recherchée. Le facteur de croissance TGF- $\beta$ 1, présent dans les cellules de Sertoli et les cellules périvitubulaires du testicule adulte, inhibe *in vitro* la prolifération des cellules germinales de fœtus de souris [26]. Si le TGF- $\beta$ 1 est produit par les gonades embryonnaires, il peut en conséquence inhiber la prolifération des cellules germinales fœtales, voire induire leur dégénérescence, puisque ce facteur est parfois identifié comme signal inducteur de la mort cellulaire par apoptose. Enfin, une substance proche du TGF- $\beta$ 1, le MIS (*mullerian inhibiting substance*, appelée aussi AMH *Anti-Mullerian Hormone* [27, 28]), ne peut être responsable du maintien en interphase des jeunes spermatogonies comme on a pu le proposer [29], puisque cette hormone est produite par les cellules de Sertoli de fœtus de rat, alors qu'à la même époque les gonocytes sont encore en train de se multiplier. Le bilan des données relatives au contrôle de la régulation du nombre des cellules germinales fœtales comporte plus d'hypothèses que de certitudes, et plus d'éléments concernant d'éventuelles stimulations des mitoses des cellules germinales fœtales que d'éléments (certains hypothétiques) concernant des inhibitions ou des dégénérescences. Enfin, lorsque les recherches auront progressé, il restera à déterminer le mécanisme prépondérant, différent peut-être en fonction de l'âge et (ou) en relation avec la présence, dans les cellules germinales, de récepteurs de la thymuline, des facteurs mitogènes et autres inducteurs de la dégénérescence cellulaire ■

## Summary

### Foetal germ cell proliferation in 1993

The evolution of foetal germ cell number is well known, but the mechanisms of control of germ cell proliferation are poorly understood. In the recent years, the pituitary-adrenalo-thymic axis has been involved: thymulin, a thymic factor, increases foetal germ cell proliferation. In addition, corticosterone prevents the thymus from secreting thymulin *in vitro* and in these conditions the thymus does not stimulate the germ cell proliferation. Furthermore germinostatic factor, produced *in vitro* by fetal testis and follicular cells from rat prepubertal females activates or inhibits gonial proliferation respectively. These results and the role of other substances suspected of acting on foetal germ cell proliferation or degeneration are discussed.

## Remerciements

J. Prépin remercie la Fondation pour la Recherche Médicale pour son soutien financier et le Pr Ch. Thibault pour avoir, pendant plusieurs heures, discuté du projet d'article.

## TIRÉS A PART

J. Prépin.