

## Le déterminisme de l'atrophie d'un organe rudimentaire: le canal de MÜLLER des embryons mâles d'oiseaux

Par ÉTIENNE WOLFF, Strasbourg<sup>1</sup>

L'étude du développement embryonnaire des canaux de MÜLLER des oiseaux présente un double intérêt. D'abord le canal de MÜLLER représente un des exemples les plus précoces de différenciation sexuelle. En second lieu il nous donne un exemple caractéristique de l'atrophie d'un organe au cours de la vie embryonnaire. Cette étude peut donc nous renseigner d'une part sur le mécanisme de la différenciation sexuelle, d'autre part sur les conditions qui conduisent à l'atrophie d'un organe. Le présent article montrera la continuité des recherches qui se poursuivent depuis

### I. - LES ÉTAPES DE LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

#### A. - Phénomènes morphologiques

C'est un fait bien connu que les canaux de MÜLLER suivent d'abord, dans les deux sexes, la même évolution (Fig. 1a). La première différenciation apparaît chez le poulet vers le 9<sup>e</sup> jour de l'incubation. Les canaux de MÜLLER ♂ restent grêles, alors que les canaux de MÜLLER ♀ continuent à croître en longueur et surtout en épaisseur. Au 13<sup>e</sup> jour, la différenciation sexuelle s'accuse. Les canaux de MÜLLER ♂ régressent

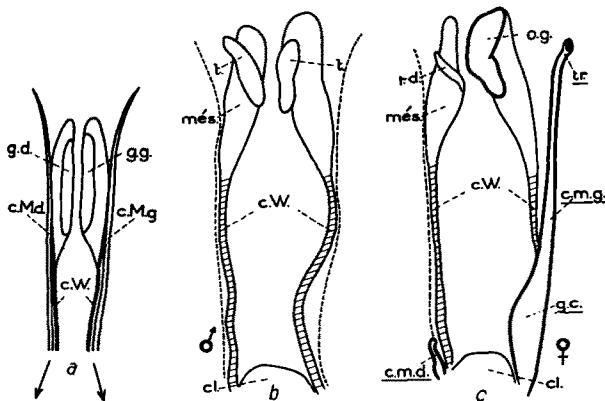


Fig. 1. Schéma de l'évolution divergente des tractus génitaux mâles et femelles à partir d'un stade commun indifférencié. a Stade indifférencié. Présence de deux canaux de MÜLLER dans les deux sexes (7<sup>e</sup> jour de l'incubation); b Tractus mâle vers le 15<sup>e</sup> jour de l'incubation. Disparition complète des canaux de MÜLLER; c Tractus femelle au même stade (18<sup>e</sup> jour). Le canal de MÜLLER gauche s'est développé en oviducte, la canal de MÜLLER droit régresse par sa partie proximale, il n'en reste qu'un court rudiment cloacal. Les dérivés des canaux de MÜLLER sont soulignés chez la femelle, les parties régressées sont indiquées par des traits interrompus dans les deux sexes. cl.: cloaque; C.M.g., c.M.d.: canaux de MÜLLER gauche et droit; c.W.: canaux de WOLFF; g.g., g.d.: gonades gauche et droite; g.c.: glande coquillière; més.: mésonephros; O.g.: ovaire gauche; r.d.: rudiment gonadique droit; t.: testicule; tr.: trompe. (d'après Et. WOLFF).

plusieurs années dans mon laboratoire et les progrès réalisés vers la connaissance des facteurs de la différenciation et de la régression<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Institut de Zoologie et d'Embryologie expérimentale, Université de Strasbourg.

<sup>2</sup> Les recherches résumées dans cet article ont été, sauf indication contraire, effectuées au Laboratoire d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences de Strasbourg, avec l'appui du Centre national de la Recherche scientifique française.



Fig. 2.



Fig. 3.

Fig. 2. Tractus génital femelle d'un embryon de 18 jours. Le canal de MÜLLER gauche a donné l'oviducte, qui comprend différentes régions spécialisées: trompe, oviducte proprement dit, glande coquillière. Il ne subsiste du canal de MÜLLER droit qu'un rudiment cloacal, bien visible sur cette figure. Parties dérivées des canaux de MÜLLER: c.M.d.: rudiment du canal droit; g.c.: glande coquillière; ov.: oviducte proprement dit; tr.: trompe; autres organes: c.W.: canaux de WOLFF; g.d.: gonade droite rudimentaire; ov.: ovaire.

Fig. 3. Tractus génital mâle d'un embryon de 17 jours. Il n'y a plus aucune trace des canaux de MÜLLER, c.W.: canaux de WOLFF; test.: testicules; ur.: urètres.

complètement, tandis que le canal de MÜLLER gauche de la ♀ continue à s'accroître; il donnera l'oviducte de

l'adulte. Le canal de MÜLLER droit, au contraire, entre à son tour en régression. Le processus de la différenciation sexuelle est terminé; il reste chez la ♀ un oviducte issu du canal de MÜLLER gauche, du côté droit un rudiment cloacal, alors que, chez le ♂ normal, les canaux de MÜLLER ont complètement disparu à ce stade (Fig. 1 à 3).

L'étude histologique montre qu'une première phase de la régression des canaux ♂ se place au 9<sup>e</sup> jour de l'incubation. Cette phase est caractérisée par la dégénérescence soudaine de l'épithélium du canal de MÜLLER, qui disparaît bientôt complètement, alors que l'enveloppe conjonctive du canal persiste, sous la forme d'un cordon plein, jusqu'au 13<sup>e</sup> ou 14<sup>e</sup> jour de

l'incubation (Fig. 4 et 5). Cette maquette conjonctive s'amincit progressivement et finit par disparaître. La régression se fait donc en deux temps: d'abord la dégénérescence brusque du canal proprement dit et, dans une deuxième phase, la dégénérescence progressive de son enveloppe mésenchymateuse (WOLFF et LUTZ-OSTERTAG<sup>1</sup>).

#### B. — Recherches quantitatives sur la croissance et la régression

Le dosage de l'azote total, à l'aide d'une ultra-micro-méthode dérivée de la technique de KJELDAHL, a permis à PFLEGER et VENDRELY<sup>2</sup> de préciser l'évolution quantitative des canaux de MÜLLER ♂ et ♀. On constate (courbes de la Fig. 6) que, jusqu'au 9<sup>e</sup> jour, les canaux de MÜLLER ♂ et ♀, droits ou gauches, suivent la même loi de croissance. A partir du 9<sup>e</sup> jour, le dosage d'azote total montre chez le ♂ une diminution qui va en s'accroissant (Fig. 6) jusqu'à la disparition totale des canaux (13<sup>e</sup> jour). Au contraire, chez la ♀, le canal gauche continue régulièrement sa croissance, alors que, dès ce stade, le canal droit montre une divergence avec le canal gauche, que la morphologie ne permettait pas, à elle seule, de mettre en évidence (Fig. 6). Une méthode microchimique quantitative précise donc les lois de la croissance et de la régression des deux canaux. Elle rend manifeste, dès leur début, des variations qui n'apparaissent ni à l'étude anatomique ni à l'étude histologique.

#### II. — DÉMONSTRATION DU RÔLE DES HORMONES EMBRYONNAIRES DANS LA DIFFÉRENCIATION SEXUELLE

Quelle est la cause de la différence entre l'évolution ♂ et l'évolution ♀ des canaux de MÜLLER? *A priori* deux hypothèses peuvent être invoquées.

- 1° Il existe dans le sexe ♂ un facteur de régression des canaux de MÜLLER.
- 2° Les canaux de MÜLLER sont spontanément voués à la régression, mais il existe dans le sexe ♀ un facteur qui les maintient et les incite au développement.

De nombreuses expériences ont montré que ces facteurs sont de nature hormonale. Les uns sont favorables à la première hypothèse, d'autres semblent apporter un argument en faveur de la seconde. On peut actuellement donner de ces phénomènes l'explication suivante: L'hormone ♂ et l'hormone ♀, sécrétées par les gonades embryonnaires au moment même de la différenciation sexuelle, sont les facteurs déterminants des processus de régression et de différenciation des canaux de MÜLLER. L'hormone ♂ joue un rôle prépondérant en tant que facteur de régression. L'hormone ♀

Fig. 4 et 5. Etapes de la régression du canal de MÜLLER mâle.

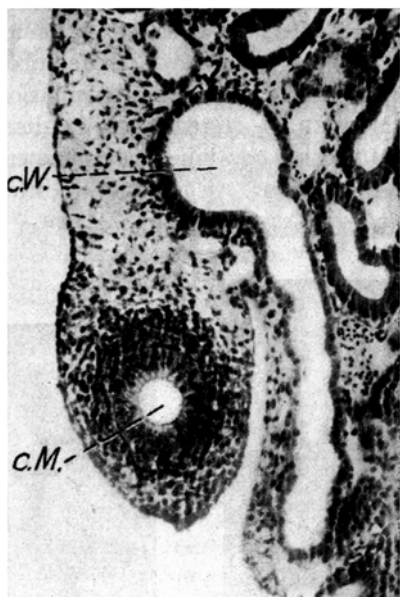


Fig. 4. Coupe d'un canal de MÜLLER indifférencié, montrant le conduit épithélial, entouré de sa gaine conjonctive.

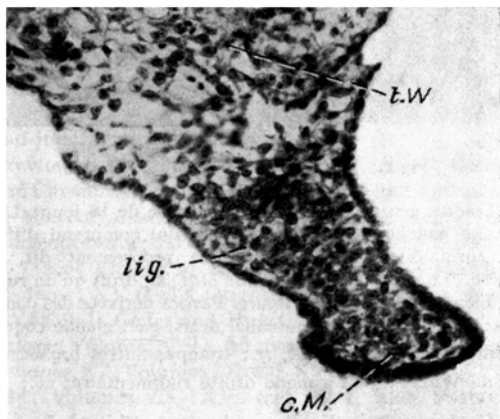


Fig. 5. Coupe du cordon conjonctif qui subsiste seul après la régression du canal proprement dit (10<sup>e</sup> jour de l'incubation).

C.M.: canal de MÜLLER; lig.: ligament du canal de MÜLLER; t.W.: tunique du canal de WOLFF (d'après ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG).

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG, Arch. Anat. Hist. Embryo. 34, 459 (1952).

<sup>2</sup> D. PFLEGER et R. VENDRELY, C. r. Soc. Biol. 145, 1699 (1950).

*n'est pas nécessaire au maintien des canaux de MÜLLER chez la ♀, mais elle paraît exercer son influence sur leur développement et leur différenciation définitive.* Ce rôle déterminant des hormones sexuelles a été démontré par différentes méthodes.

A. — Méthode des injections d'hormones sexuelles cristallisées

1° Injection d'hormone ♀. Les premières expériences d'injection d'hormone ♀ ont été faites en 1935<sup>1</sup> par ÉT. WOLFF et GINGLINGER et continuées par ÉT. WOLFF et ses collaborateurs de 1936 à 1947. Des substances œstrogènes, l'œstrone, le benzoate d'œstradiol, le stilbœstrol, les acides doisynolique et allénolique, injectés à l'embryon au 6<sup>e</sup> jour de l'incubation, c'est-à-dire avant le stade de la différenciation sexuelle des gonades, déterminent chez le ♂ la féminisation des gonades et du tractus génital. Les canaux de MÜLLER subsistent partiellement ou totalement (Fig.7). Avec des doses élevées d'œstrogène, le tractus génital correspond exactement au type ♀. L'intervention a donc pour résultat de maintenir des canaux qui normalement devraient s'atrophier. Mais on ne peut savoir si l'action de l'hormone est directe ou indirecte, car l'effet de l'œstrogène s'exerce à la fois sur les gonades et sur les canaux<sup>2</sup>. Comme les change-

Fig. 7 et 8. Action des hormones cristallisées sur le développement des canaux de MÜLLER.

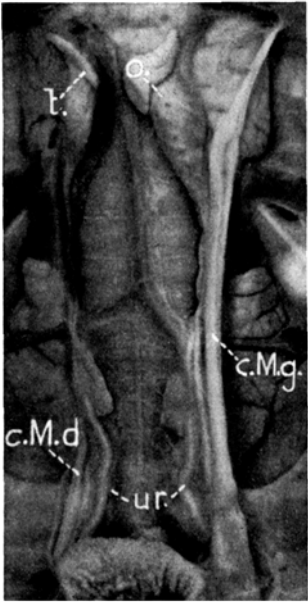


Fig. 7. Action d'une hormone femelle sur le tractus génital d'un embryon mâle. Persistance et développement du canal de MÜLLER gauche, qui évolue en oviducte. A droite, il subsiste un rudiment cloacal comme chez la femelle. (Noter l'action corrélatrice sur les gonades: la gonade gauche est transformée en ovaire, le testicule droit est rudimentaire.)

Stade: 20 jours d'incubation. C.M.g., c.M.d.: canaux de MÜLLER gauche et droit; O.: ovaire; t.: testicule; ur.: urètres.

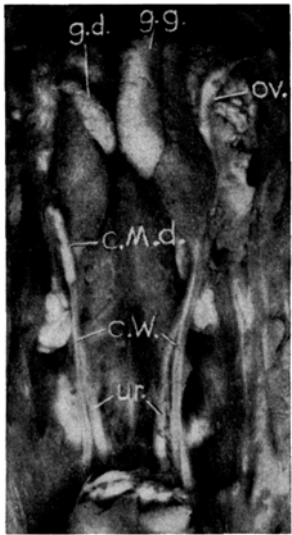


Fig. 8. Action d'une hormone mâle sur le tractus génital d'un embryon femelle. Régression des canaux de MÜLLER, à l'exception de deux courts segments proximaux à droite et à gauche (c.M.d. et g.d., g.g.: gonades droite et gauche. ov.) (d'après ÉT. WOLFF).

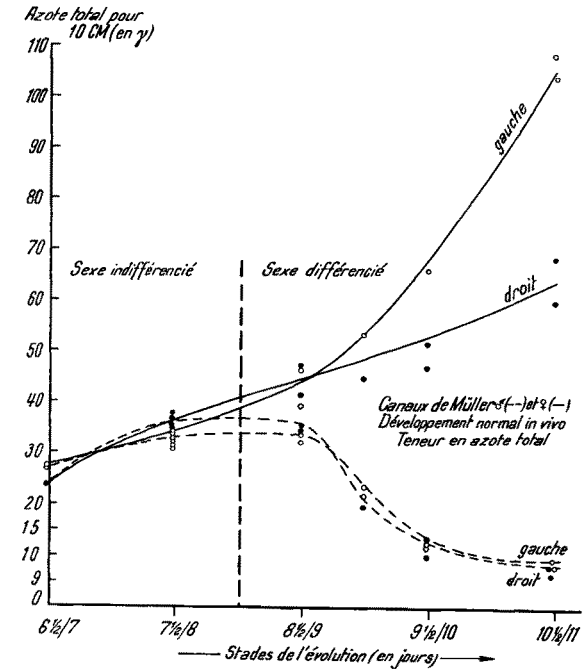


Fig. 6. Evolution de l'azote total des canaux de MÜLLER mâles et femelles de l'embryon de poulet, au cours du développement normal. Les courbes en trait plein correspondent aux canaux ♀, les courbes en trait interrompu aux canaux ♂. (D'après D. PFLEGER et R. VENDRELY).

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF et A. GINGLINGER, Arch. Anat. Hist. Embryo. 20, 219 (1935).  
<sup>2</sup> Nos premières recherches qui montraient la puissance stimulatrice des hormones œstrogènes sur la sphère génitale, nous amenaient à penser à une action stabilisatrice de l'hormone femelle sur les

canaux de MÜLLER. Un tel point de vue est exposé dans un article publié en 1938<sup>3</sup>. Depuis lors, de nouvelles recherches qui sont résumées ici, ont démontré qu'en l'absence d'hormones femelles les canaux se maintiennent et s'accroissent, tandis que la présence d'une hormone mâle les fait régresser. D'où l'idée que l'action de l'hormone mâle est prépondérante dans la différenciation sexuelle, et que l'action stabilisatrice de l'hormone femelle sur les canaux mâles serait en réalité un effet indirect.  
<sup>3</sup> ÉT. WOLFF, Trav. Stat. Zool. Wimereux 1938, 827.

ments subis par les gonades consistent d'une part en une atrophie de la partie testiculaire, d'autre part en une stimulation de la partie ovarienne, il est difficile de savoir si le maintien des canaux de MÜLLER est dû à l'action stimulatrice de l'hormone ou à l'inhibition qu'elle exerce sur la sécrétion testiculaire des embryons ♂. Le fait que l'hormone femelle injectée après le 7<sup>e</sup> jour n'a plus aucune action sur le maintien des canaux de MÜLLER, alors qu'elle agit encore sur les gonades, l'inhibition temporaire qu'exerce l'hormone ♀ sur le développement de la médullaire testiculaire, et les résultats qui vont être exposés ici, parlent en faveur de la 2<sup>e</sup> hypothèse<sup>1</sup>. Toutefois des travaux encore inédits de mes collaborateurs PFLEGER et LUTZ-OSTERTAG permettent d'envisager une 3<sup>e</sup> hypothèse, qui serait valable en même temps que la seconde: l'hormone femelle aurait une action directe sur les canaux de MÜLLER, qu'elle *protègerait* contre l'effet nécosant de l'hormone mâle.

2° Injection d'hormone ♂. On a d'abord injecté de l'Androstérone (ET. WOLFF<sup>2</sup>) dans les mêmes conditions que l'hormone ♀ aux embryons d'oiseau. Puis un grand nombre de substances androgènes ont été éprouvées (ET. WOLFF, G. STRUDEL et EM. WOLFF<sup>3</sup>). Ces substances androgènes ont toutes donné des résultats analogues, au degré d'intensité près. Elles n'ont qu'une faible action sur les gonades ♀, dont la différenciation sexuelle n'est pas modifiée. Mais elles ont toutes une action plus ou moins intense sur le tractus génital. Les canaux de MÜLLER de la ♀ subissent une régression qui peut aller jusqu'à la suppression de l'oviducte, à l'exception toutefois d'un petit tronçon correspondant à la région antérieure des trompes (Fig. 8). Dans ce cas encore, il est difficile de dire si l'action des hormones androgènes sur les canaux de MÜLLER est directe ou indirecte. Toutefois, le fait que la structure des ovaires n'est pas sensiblement modifiée, parle en faveur d'une action directe de l'hormone. Des expériences qui éliminent l'action éventuelle de la gonade peuvent seules résoudre la question.

3° Méthode des greffes cœlomiques. Le fait que des substances hormonales cristallisées ont sur les canaux de MÜLLER une action morphogène comparable à celle qui se manifeste au moment de la différenciation sexuelle normale, ne prouve pas que de tels facteurs existent normalement chez l'embryon. Pour résoudre ce problème, des greffes de gonades embryonnaires ont été pratiquées sur de jeunes embryons de poulet: greffes de fragments d'ovaire sur des embryons ♂, greffes de fragments de testicules sur des embryons ♀.

La technique employée a été celle des greffes cœlomiques; elle consiste à introduire, dans l'espace cœlomique de l'embryon de 2 à 3 jours des fragments

de glandes génitales déjà différenciées, notamment plus âgées (E. WOLFF<sup>1</sup>). Les résultats ont été particulièrement frappants, à la suite de greffes de testicule à des embryons femelles. Chez ceux-ci, les glandes génitales se différencient normalement en ovaires, mais les canaux de MÜLLER sont totalement abolis (Fig. 9). Ces expériences démontrent donc que les testicules d'un embryon différencié sécrètent une substance hormonale capable d'entraîner la régression totale des canaux de MÜLLER. Les substances hormonales androgènes et les sécrétions des testicules embryonnaires ont des effets homologues.



Fig. 9. Action d'une greffe testiculaire sur le tractus génital femelle: disparition complète des canaux de MÜLLER. On voit sur la photographie le greffon testiculaire mâle (gr. ♂). Les gonades de l'hôte ne sont pas modifiées. c.W.: canal de WOLFF gauche; gd.: rudiment gonadique droit; o.: ovaire (d'après ET. WOLFF).

4° Méthode de la castration embryonnaire. Si les testicules différenciés de l'embryon d'oiseau sécrètent des substances capables de déterminer éventuellement, mais dans des conditions expérimentales anormales, la régression des canaux de MÜLLER, il n'est pas certain que, dans les conditions normales, de telles sécrétions sont actives et que la régression en dépend nécessairement. Des expériences, dans lesquelles les gonades sont éliminées précocement, apportent la solution au problème. La castration a été obtenue sur des embryons de 3 à 4 jours, c'est-à-dire bien avant le stade de la différenciation sexuelle, par une technique d'irradiation localisée utilisant les rayons X. Des castrations totales, unilatérales ou partielles ont été obtenues, suivant les expériences (ET. WOLFF et EM. WOLFF<sup>3</sup>).

La castration totale d'embryons ♂ ou ♀ de poulet, dont le sexe génétique a pu être reconnu par des critères morphologiques relatifs au plumage, a donné les résultats suivants. En l'absence totale de gonades ♂ ou ♀, les canaux de MÜLLER subsistent. Tous deux

<sup>1</sup> ET. WOLFF, Trav. Stat. Zool. Wimereux 1938, 827.

<sup>2</sup> ET. WOLFF, C. r. Soc. Biol. 120, 1314 (1935).

<sup>3</sup> ET. WOLFF, G. STRUDEL et EM. WOLFF, Arch. Anat. Hist. Embryo. 31, 237 (1948).

<sup>1</sup> ET. WOLFF, Arch. Anat. micro. Morph. exp. 36, 69 (1947).

<sup>2</sup> ET. WOLFF et EM. WOLFF, J. Exp. Zool. 116, 59 (1951).

se développent à un stade où ils ont complètement disparu chez le ♂, et où chez la ♀ le gauche seul subsiste dans son intégrité (Fig. 10). Dans les cas de castration partielle ou unilatérale, la présence d'un seul testicule ou d'une partie importante d'un testicule suffit à entraîner la régression complète des canaux de MÜLLER. Dans le sexe ♀, la persistance de l'une des gonades, droite ou gauche, suffit à entraîner l'atrophie du canal de MÜLLER droit.

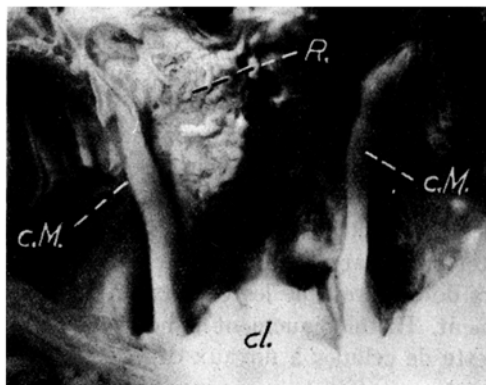


Fig. 10. Effets de la castration sur le développement des canaux de MÜLLER. Persistence des deux canaux de MÜLLER chez un embryon mâle âgé de 15 jours. *cl.*: cloaque; *c.M.*: canaux de MÜLLER; *R.*: métanéphros (d'après ÉT. WOLFF et EM. WOLFF).

Ces résultats démontrent donc qu'une substance hormonale, issue des testicules embryonnaires, intervient réellement dans la régression normale des canaux de MÜLLER ♂. Ils démontrent d'autre part qu'une substance, issue de l'une ou l'autre des gonades femelles, intervient dans la régression du canal de MÜLLER droit chez la femelle.

### III. — MODE D'ACTION DES HORMONES SEXUELLES DANS LA DIFFÉRENCIATION ET LA RÉGRESSION

Les recherches qui viennent d'être exposées démontrent l'action de substances hormonales, issues des glandes génitales, dans les phénomènes de la différenciation et de la régression des canaux de MÜLLER. Elles ne prouvent pas que cette action des hormones est directe. Seules des techniques d'explantation peuvent montrer que les hormones des gonades embryonnaires ou les substances hormonales cristallisées agissent directement sur les canaux de MÜLLER, sans intermédiaire d'aucune autre corrélation de l'organisme. C'est à cet effet que nous avons entrepris des explantations *in vivo* (ÉT. WOLFF et OSTERTAG<sup>1</sup>) et *in vitro* de canaux de MÜLLER à différents stades. Nous évoquons ici uniquement les résultats des cultures *in vitro*.

#### A. — Culture en milieu an hormonal

Grâce à une technique de culture d'organes embryonnaires, valable pour un grand nombre de tissus et d'organes, nous avons pu obtenir non seulement la survie, mais encore le développement et la différenciation des canaux de MÜLLER cultivés *in vitro*. La technique employée est celle que nous avons mise au point pour la culture des gonades embryonnaires (ÉT. WOLFF et HAFEN<sup>1</sup>). L'évolution des canaux de MÜLLER *in vitro* dépend du sexe et du stade de développement de l'embryon (ÉT. WOLFF et LUTZ-OSTERTAG<sup>2</sup>). Si l'on prélève des canaux au stade indifférencié, ceux-ci survivent et continuent à se développer (Fig. 11a), quel que soit le sexe de l'embryon, qui est révélé par la culture connexe des gonades droites<sup>3</sup>. Si par contre on s'adresse à des embryons de plus de 9 jours, dont les gonades commencent à effectuer leur différenciation sexuelle, les résultats sont différents suivant qu'on s'adresse à des ♂ ou à des ♀. Les canaux de MÜLLER ♀ de plus de 9 jours, explantés *in vitro*, continuent leur développement et se différencient en

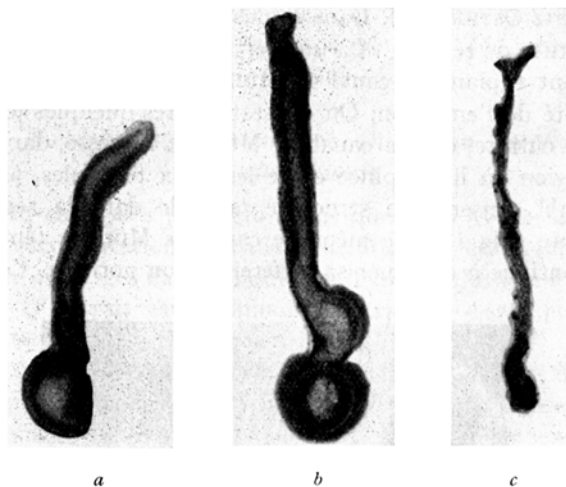


Fig. 11. Evolution des canaux de MÜLLER en culture *in vitro*. a Culture *in vitro* d'un canal de MÜLLER prélevé au stade indifférencié (7 jours). Quel que soit le sexe du donneur, le canal se différencie en un oviducte normal.

b Evolution d'un canal de MÜLLER femelle prélevé à l'âge de 9 jours et cultivé pendant 5 jours *in vitro*. Organisation en oviducte, différenciation d'un renflement volumineux (glande coquillière) dans la région cloacale.

c Régression d'un canal de MÜLLER mâle, prélevé au 9<sup>e</sup> jour et cultivé 4 jours *in vitro*. L'aspect du canal est grêle et corrodé, les parties sombres correspondent à des vestiges, plus ou moins nécrosés, du canal épithélial, les parties plus claires ne comportent que du tissu conjonctif, la lumière du canal et l'épithélium ayant complètement disparu (d'après ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG).

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF et K. HAFEN, C. r. Soc. Biol. Paris 145, 1388 (1951); J. Exp. Zool. 119, 381 (1952).

<sup>2</sup> ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG, Bull. Assoc. Anat. 39<sup>e</sup> réunion (Clermont-Ferrand) 72, 214 (1952).

<sup>3</sup> Ce résultat confirme et renforce les conclusions des recherches sur la castration embryonnaire, dont il a été question plus haut. Les deux séries de recherches démontrent qu'en l'absence d'hormones sexuelles, les canaux de MÜLLER des deux sexes ne sont pas voués à l'atrophie.

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF et Y. OSTERTAG, C. r. Soc. Biol. 143, 866 (1949).

oviductes (Fig. 11b), marqués en particulier par la présence d'un fort renflement cloacal, ébauche de la glande coquillière.

Au contraire, les canaux de MÜLLER ♂, déjà plus fins au moment du prélèvement, s'amenuisent de plus en plus. On les voit se réduire à un mince cordon dont la lumière est abolie (Fig. 11c). Les préparations histologiques de ces cordons montrent des tissus profondément nécrosés. L'étude morphologique et histologique indique donc que les canaux de MÜLLER ♂ sont voués à l'atrophie, dès le moment où s'amorce la différenciation sexuelle des gonades. Il est logique de se demander si la sécrétion des testicules embryonnaires n'agit pas *directement* sur des organes, qui, en son absence, ne subiraient aucune atrophie.

#### B. — Culture en présence de testicules

Pour éprouver l'action directe de l'hormone ♂ embryonnaire sur les canaux de MÜLLER, on place, dans le même milieu de culture que précédemment, un canal indifférencié au contact de deux testicules prélevés sur un embryon un peu plus âgé (ÉT. WOLFF, HAFFEN et LUTZ-OSTERTAG<sup>1</sup>). Dans le même milieu on explante, à titre de témoin, et à une certaine distance du précédent explant, le canal de MÜLLER prélevé de l'autre côté de l'embryon. On constate, après quelques jours de culture, que le canal de MÜLLER régresse, dans la région où il est pincé entre les deux testicules, alors qu'il conserve sa structure normale dans la région libre (Fig. 12). De même le canal de MÜLLER témoin continue à effectuer sa différenciation normale. Cette

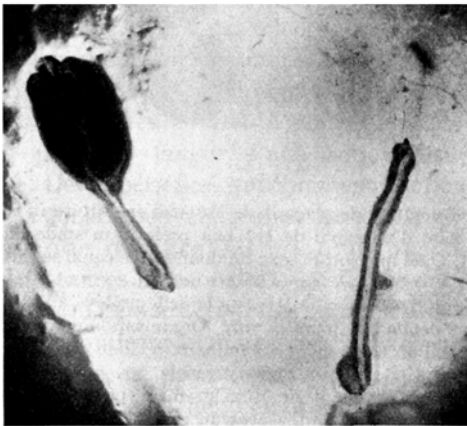


Fig. 12. Action de la sécrétion des testicules sur les canaux de MÜLLER. A gauche un canal de MÜLLER au contact des deux testicules, à droite: canal de MÜLLER témoin cultivé sur le même milieu. Les deux canaux sont issus du même embryon. Noter la disparition complète du canal entre les deux testicules.

régression du canal de MÜLLER au voisinage d'une gonade ♂ est caractérisée, comme chez l'embryon normal, par la disparition complète du canal épithélial sur

une certaine longueur, en d'autres points il persiste un canal étroit dont l'épithélium est réduit à quelques cellules et dont la lumière est parfois oblitérée. L'expérience démontre donc l'action directe sur les canaux d'une hormone élaborée par les testicules embryonnaires, sans l'intermédiaire d'aucun autre organe et d'aucun autre tissu de l'embryon.

#### C. — Culture de canaux de MÜLLER en présence d'hormones sexuelles cristallisées (ÉT. WOLFF et LUTZ-OSTERTAG<sup>1</sup>).

1° Action des hormones ♂. Le propionate de testostérone et l'androstérone ont été utilisés en suspension aqueuse ajoutée au milieu de culture. Les explants soumis à l'expérience sont soit des canaux de MÜLLER indifférenciés de 7 jours, soit des canaux de MÜLLER ♀ de 9 jours. Si l'on utilise des suspensions denses, contenant par exemple 1,6 mg de propionate de testostérone par centimètre cube, on constate, après 4 jours de culture, que les canaux se nécrosent complètement. Histologiquement il ne reste plus qu'une maquette de cellules à noyaux dégénérés. Les faibles doses ont pour effet de provoquer tous les phénomènes intermédiaires entre le développement normal et la nécrose complète. La nécrose commence dans le tissu conjonctif, elle atteint ensuite l'épithélium du canal qui se désorganise (Fig. 13b), puis dégénère complètement. Il ne reste finalement qu'un cordon plein nécrosé, avec quelques rares cellules conjonctives vivantes.

Il est très remarquable de constater que, dans ce même milieu où les canaux de MÜLLER se nécrosent

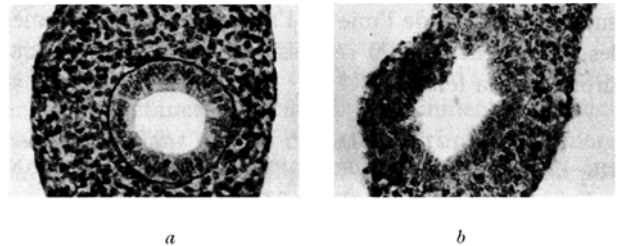


Fig. 13. Action d'une hormone mâle cristallisée, le propionate de testostérone, sur des canaux de MÜLLER cultivés *in vitro*.

a Canal de MÜLLER de 7 jours: coupe transversale montrant l'épithélium du canal constitué de cellules cylindriques hautes entourées par une enveloppe de tissu conjonctif.

b Aspect d'un canal de MÜLLER de 7 jours, cultivé sur un milieu contenant du propionate de testostérone. Dégénérescence du tissu conjonctif, la nécrose commence à atteindre l'épithélium du canal qui tend à se désorganiser (d'après ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG).

complètement, d'autres organes tels que les gonades et les canaux de WOLFF se cultivent très bien et conservent leur intégrité structurale. On observe même que, dans un explant qui contient à la fois le canal de MÜLLER et le canal de WOLFF, celui-ci conserve son intégrité, tandis que celui-là dégénère complètement.

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF, Y. LUTZ-OSTERTAG et K. HAFFEN, C. r. Soc. Biol., séance du 11 juillet 1952 (à l'impression).

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG, Bull. Assoc. Anat., 39<sup>e</sup> réunion (Clermont-Ferrand) 72, 214 (1952).



On pouvait penser à une action toxique de la substance hormonale; à la suite de ces expériences témoins, on ne peut plus penser à une toxicité banale, mais à une toxicité spécifique qui retentit exclusivement sur les canaux de MÜLLER. On se trouve en présence d'une de ces actions lésantes, spécifiques, qui ont été démontrées par P. ANCEL dans des expériences de chimiotératogénèse. De telles recherches ont montré l'action élective de certaines substances sur des tissus ou organes particuliers de l'embryon. On se trouve donc en présence d'une substance ayant des propriétés analogues aux substances tératogènes, qui exercent leur action sur des organes ou ébauches d'organes, à un stade déterminé du développement.

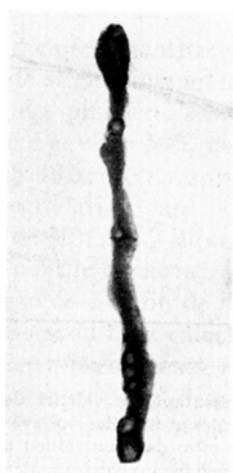


Fig. 14. Action de l'hormone femelle sur les canaux de MÜLLER cultivés *in vitro*. Le canal de MÜLLER a régressé sur une grande partie de sa longueur où il ne reste plus que du tissu conjonctif, mais certains segments du canal ont échappé à la nécrose et se sont renflés en vésicules sous l'influence de l'hormone femelle (comparer avec la fig. 12c).

2° Action d'une hormone ♀ (ET. WOLFF et LUTZ-OSTERTAG<sup>1</sup>). Nous avons utilisé une substance hormonale soluble dans l'eau, le sel de sodium de l'acide n-bis-déhydrodoïsynolique<sup>2</sup>. Nous avons soumis à l'action de cette substance des canaux de MÜLLER d'embryons ♂ au début de la différenciation sexuelle, c'est-à-dire au début du processus de la régression. Dans ces conditions les canaux de MÜLLER se présentent après plusieurs jours de culture comme un conduit grêle présentant un chapelet de petites vésicules (Fig. 14). Ces vésicules sont des vestiges du canal épithélial, qui a disparu dans les parties intermédiaires. Entre elles le cordon est une formation pleine comprenant exclusivement du tissu conjonctif. L'atrophie n'est donc pas complètement évitée, elle est manifeste dans certains tronçons, mais elle est bien moins intense que dans un canal de MÜLLER ♂ cultivé en l'absence d'hor-

none, comme c'est le cas du canal controlatéral du même embryon. L'effet de l'hormone ♀ est donc, sinon de maintenir les canaux de MÜLLER, du moins de préserver les tronçons non encore atteints par la nécrose et de les stimuler au développement.

De ces expériences de culture, il résulte que les hormones sexuelles exercent directement leur action sur les canaux de MÜLLER. Dans les expériences de culture *in vitro*, l'hormone ♂ élaborée par les gonades embryonnaires, ou les substances androgènes cristallisées, exercent directement et électivement leur action sur les canaux de MÜLLER, quel que soit leur sexe génétique. L'hormone ♀ paraît exercer une action stimulatrice sur les tissus de ces organes qui n'ont pas encore été atteints par la nécrose.

#### IV. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTION DIASTASIQUE DANS LE PHÉNOMÈNE DE LA RÉGRESSION

Nous connaissons donc l'agent déterminant de la régression des canaux de MÜLLER. C'est une hormone ♂. Mais si nous connaissons la cause de ces processus<sup>1</sup>, nous n'en connaissons pas les mécanismes, les réactions intermédiaires. Les recherches qui vont être exposées dans ce chapitre permettent de pénétrer plus intimement dans le mécanisme du phénomène.

##### A. — Expériences d'explantation en milieu aseptique (pseudo-cultures)

Au cours des premiers essais que nous avons faits sur l'explantation des canaux de MÜLLER, ces organes sont immergés dans le liquide de Tyrode, additionné ou non d'extrait embryonnaire. L'expérience est conduite en milieu aseptique à la température de 37°. Ce milieu permet une survie plus ou moins longue des organes immergés (ÉT. WOLFF, OSTERTAG et PFLEGER<sup>2</sup>). Ceci est vrai des canaux de MÜLLER des deux sexes, prélevés avant le 9<sup>e</sup> jour de l'incubation, et des canaux de MÜLLER ♀ après le 9<sup>e</sup> jour. Ils conservent leur aspect morphologique normal et une structure histologique saine pendant plusieurs jours (de 1 à 5 jours après l'explantation). La nécrose qui se produit, par suite, d'une asphyxie progressive et d'une insuffisante nutrition, est lente et discrète; elle ne se traduit extérieurement qu'après de longs jours. A l'aspect histologique, des cellules nécrosées sont éliminées par petits paquets dans la lumière du canal, la dégénérescence ne commence à affecter la masse des tissus qu'après 48 h, parfois 3 à 5 jours seulement après le prélèvement.

Il en est tout autrement des canaux ♂ prélevés le 9<sup>e</sup> jour de l'incubation. Dès le premier jour de l'explantation, on voit la paroi du canal changer d'aspect; elle

<sup>1</sup> ÉT. WOLFF et Y. LUTZ-OSTERTAG, Bull. Assoc. Anat., 39<sup>e</sup> réunion (Clermont-Ferrand) 72, 214 (1952).

<sup>2</sup> Obligéamment fournie par les Drs MIESCHER et WETTSTEIN des Etablissements Ciba.

<sup>1</sup> Nous faisons abstraction des enchaînements antérieurs à l'élaboration de l'hormone, qui ont trait au mécanisme d'action des gènes sexuels et sont encore inconnus.

<sup>2</sup> ÉT. WOLFF, Y. OSTERTAG et D. PFLEGER, C. r. Soc. Biol. Paris 144, 280 (1949); C. r. Acad. Sci. 229, 1263 (1949).

se corrode, devient transparente, puis se résorbe. Nous avons eu la surprise de constater dans certains cas la disparition presque complète du canal en moins de 24 h. Le phénomène commence à la partie caudale et s'étend en direction céphalique. Ainsi le canal régresse et se désagrège hors de l'organisme, comme s'il se digérait et se dissolvait dans le milieu. Cette régression affecte les 2/3, parfois les 9/10 de la longueur du canal. On peut brièvement résumer les faits en disant que les canaux de MÜLLER ♂ subissent une autolyse soudaine et accélérée *in vitro*, tandis que les canaux ♀ sont le siège d'une autolyse lente et ménagée, conforme à la destinée habituelle des tissus explantés en milieu aseptique.

Cette atrophie d'un organe *in vitro* en milieu aseptique et en l'absence de tout apport de substances humorales extérieures à lui ne peut être interprétée que comme une digestion, dont les agents seraient élaborés par l'organe lui-même. Il faut donc rechercher les preuves d'une activité diastasique dans l'explant et dans le milieu: à l'intérieur de l'organe la source de la diastase, à l'extérieur les produits de son activité. Le problème se posera en outre de savoir si le mécanisme de la régression *in vitro* est le même que dans l'organisme normal. Il faudra encore expliquer quelle relation existe entre l'hormone ♂ et la diastase hydrolysante; car, si celle-ci se révèle être un facteur important de la régression, il ne faut pas oublier que l'hormone ♂ en est l'agent déterminant.

#### B. — Mesure de l'autolyse par le dosage de l'azote total de l'explant et du milieu

Un procédé quantitatif pour comparer l'autolyse des explants ♂ et des explants ♀ consiste à doser l'azote dans l'organe et dans le milieu à différents stades de l'expérience. Ces dosages ont été effectués systématiquement dans notre laboratoire par PFLEGER<sup>1</sup>, suivant une ultra-microméthode dérivée de la technique de KJELDHAL, telle qu'elle a été décrite par VENDRELY<sup>2</sup>: elle comporte une minéralisation dans des matras spéciaux, une distillation dans l'appareil de MARKHAM et une titration au moyen de la microburette de LINDERSTRÖM-LANG graduée au 1/20<sup>e</sup> de millimètre cube.

Des dosages d'azote total ont été effectués, en même temps que sur les explants, sur des témoins prélevés au même stade (9 jours à 9 jours et demi) et immédiatement soumis au traitement chimique. Si les dosages sont corrects, on doit vérifier l'équation: Azote initial (dosé sur témoins) = azote final des explants (à la fin de l'expérience) + azote perdu (retrouvé dans le milieu). Cette équation s'est vérifiée dans tous les cas, avec de très faibles écarts entre les deux membres (moins de 5% dans la plupart des cas). On est donc en droit de considérer que l'azote total initial d'un explant

correspond à la somme des deux termes du 2<sup>e</sup> membre de l'équation, qu'on appellera *azote initial calculé*. L'azote perdu représente la fraction hydrolysée, l'azote final la partie non autolysée de la substance protéique des explants. On peut comparer l'autolyse des canaux ♂ et ♀ en évaluant dans chaque cas la *perte azotée*, qui s'exprime par le quotient

$$P = \frac{N \text{ perdu dosé}}{N \text{ initial calculé}},$$

c'est-à-dire

$$P = \frac{N \text{ perdu}}{N \text{ final} + N \text{ perdu}}.$$

Les résultats, issus de 91 dosages effectués sur 396 canaux, sont résumés dans les tableaux 1 et 2.

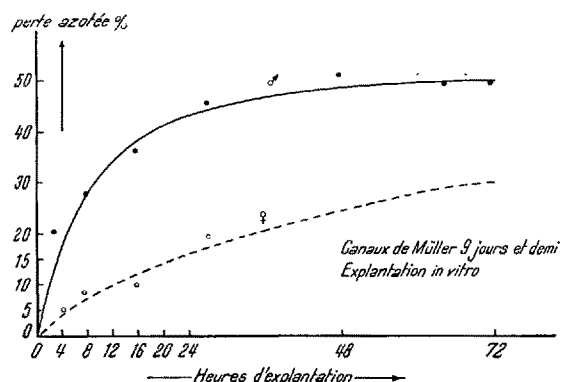


Fig. 15. Courbe représentant les valeurs de la perte azotée des canaux de MÜLLER mâles et femelles, prélevés au stade de 9 jours et demi et explantés *in vitro* dans un milieu non nutritif. En traits pleins: courbe correspondant aux canaux mâles, en traits interrompus: courbe correspondant aux canaux femelles (d'après D. PFLEGER).

La comparaison des résultats ressort des courbes de la figure 15, obtenues en portant en ordonnées la valeur en % de la perte azotée, en abscisse les durées d'explantation. La différence entre les vitesses est saisissante, surtout au cours de la première journée. On remarquera, d'après les tableaux 1 et 2, que, *même en valeur absolue*, la perte azotée est plus considérable chez les ♂ que chez les ♀ pendant les premières 24 h. Cette valeur n'est du reste pas à prendre en considération, sinon pour montrer l'ampleur du phénomène, puisqu'au stade du prélèvement les canaux ♂ sont, par suite d'un arrêt de croissance, de 3 à 4 fois moins lourds que les canaux ♀. Les courbes montrent la différence entre les valeurs relatives de la perte azotée, qui seules peuvent être comparées. On voit un écart considérable entre les courbes au cours des 30 premières heures de l'explantation, une montée brusque de la courbe ♂, alors que la courbe ♀ monte lentement. Cette divergence exprime une différence de nature entre l'autolyse ♂ et l'autolyse ♀, au moins au début du phénomène. Cette différence tend à s'atténuer après la 30<sup>e</sup> h, la brusque poussée d'autolyse ♂ se ralentit, les deux phénomènes tendent à suivre le même cours, la valeur de l'autolyse ♂ conservant toutefois l'avance acquise au début du processus.

<sup>1</sup> D. PFLEGER, C. r. Soc. Biol. 145, 425 (1951).

<sup>2</sup> R. VENDRELY, Biochem. Biophys. Acta 1, 95 (1947).



Tableau I  
Dosage de l'azote total de canaux ♂ explantés *in vitro*  
(d'après PFLEGER)

Durée de l'explantation (h)	5	8	16	27	48	65	75
N perdu dosé (en %) . . . .	4,92	5,06	9,9	6,55	11,3	12,62	10,42
N final dosé (en %) . . . .	14,87	13,25	17,42	7,96	11	13,11	10,82
Perte azotée en % . . . .	24,7	27,6	35,9	45,1	50,6	49,0	49,0

Tableau II  
Dosage de l'azote total de canaux ♀ explantés *in vitro*  
(d'après PFLEGER)

Durée de l'explantation (h)	5	8	16	27	48	65	75
N perdu dosé (en %) . . . .	2,53	4,13	4,25	11,44	12,23	10,86	17,82
N final dosé (en %) . . . .	53,28	49,28	40,15	50,38	40,21	29,61	32,34
Perte azotée (en %) . . . .	4,5	7,7	9,57	18,5	23,3	26,8	35,5

Il ressort de ces données quantitatives que les canaux ♂ de 9 jours sont le siège d'une intense activité enzymatique au cours des premières heures de l'explantation. Une autolyse d'environ 50% de leurs protides se produit en moins de 48 h; on en retrouve intégralement les produits de dégradation dans le milieu. Au contraire, les canaux de MÜLLER ♀ subissent une autolyse lente et ménagée, dont le démarrage est progressif. Le taux de la perte azotée à la fin de l'expérience reste encore très au-dessous du taux calculé dans le cas des explants ♂. Les deux phénomènes ne sont donc pas homologues. La comparaison démontre l'existence d'une activité diastasique spécifique des explants ♂.

La régression enzymatique des explants ♂ *in vitro* est-elle comparable à l'atrophie normale de ces mêmes organes à l'intérieur de l'embryon? Les deux phénomènes sont comparables qualitativement par leur aspect et leur déroulement. Nous avons vu que dans les deux cas la régression commence par l'extrémité cloacale et gagne progressivement le segment céphalique. D'autre part, la régression *in vitro* se place au même moment que dans les conditions normales, elle paraît prolonger une réaction commencée à l'intérieur de l'embryon. Au point de vue quantitatif, les résultats de la régression sont encore analogues. La perte azotée, qui pratiquement s'arrête vers 50% *in vitro*, est aussi de cet ordre de grandeur dans la régression *in vivo*, si l'on considère la période de régression qui s'étend entre 9 jours et demi et 11 jours (voir schéma de la fig. 6). (Entre 8 jours et 11 jours, elle est de plus de 60%.)

Dans les deux cas la courbe tend vers un palier – qui correspond chez le normal à la fin du 1<sup>er</sup> temps de la régression; la 2<sup>e</sup> phase (disparition de la maquette conjonctive) ne se produit normalement que vers le 13<sup>e</sup> jour. Le canal explanté, pas plus que les canaux en place, ne paraît contenir, au stade du prélèvement, le facteur responsable de la 2<sup>e</sup> phase de la régression, qui amènerait la disparition totale du tissu conjonctif résiduel.

Sans qu'on puisse demander à des tableaux de chiffres et à des courbes autre chose qu'un paral-

lélisme, on est cependant frappé de l'analogie des processus qui se déroulent *in vivo* et *in vitro* – analogie qui est du reste confirmée et renforcée par l'aspect morphologique et histologique des phénomènes. Ceci revient à dire en bref que les canaux de MÜLLER régressent très vraisemblablement chez le ♂ normal grâce à une production soudaine et intense de ferments, élaborés par l'organe lui-même et qui provoquent une autodigestion accélérée.

#### C. – Mise en évidence d'un enzyme actif dans les autolysats ♂

Dans les recherches précédentes, la présence d'enzymes dans les canaux en voie de régression était mise en évidence par les composés azotés solubles libérés dans le milieu, qui compensent exactement la perte azotée des explants. Il s'agit maintenant de montrer directement que ces enzymes sont présents dans l'organe même et qu'ils sont plus abondants (ou plus actifs) dans les canaux ♂ que dans les canaux ♀.

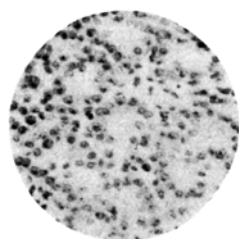
PFLEGER et VENDRELY (1951)<sup>1</sup> ont utilisé une technique de détection cytochimique des enzymes – analogue à celle qui a été employée par l'un de ces auteurs (1947)<sup>2</sup> pour l'étude de l'activité de la ribonucléase. Le test employé est la digestion de coupes minces de pancréas d'embryons de poulet, fixées et préparées suivant les techniques histologiques courantes. Ces coupes déparaffinées et réhydratées sont soumises à l'action de broyats de canaux de MÜLLER, ♂ et ♀, de 9 jours à 9 jours et demi. Les broyats sont préparés rigoureusement de la même manière dans les deux cas. Traités par le liquide de RINGER chloroformé, ils sont incubés à 37° pendant 6 à 8 h, puis centrifugés afin de fournir un extrait débarrassé de particules figurées. Dans toutes les expériences, 3 coupes de pancréas sont placées sur une même lame. L'une d'elles est soumise à l'action d'un autolysat ♂, l'une à l'action d'un autolysat ♀, la troisième sert de

<sup>1</sup> D. PFLEGER et C. VENDRELY, C. r. Soc. Biol. 146, 118 (1951).

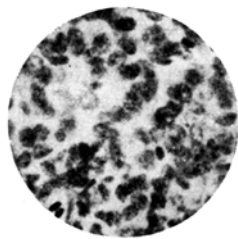
<sup>2</sup> R. VENDRELY, Biochem. Biophys. Acta 1, 95 (1947).

témoin. Toutes trois sont soumises exactement aux mêmes traitements, à part l'épreuve des autolysats. Elles sont colorées simultanément au bleu de toluidine: la coloration permet d'apprécier le degré d'attaque des différents constituants cellulaires, et partant l'intensité de l'action enzymatique.

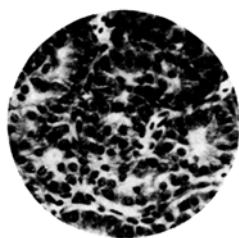
Dans ces conditions, il y a toujours une différence très nette entre les activités des extraits ♂ et des extraits ♀. Ceux-ci sont moins actifs que ceux-là, même si la masse des canaux de MÜLLER ♀ est double de celle des canaux ♂ (cas où un nombre égal de canaux ♂ et ♀ est soumis au traitement). Dans le cas où les deux catégories d'extraits proviennent d'une même masse d'organes on a obtenu les résultats suivants (Fig. 16). Au bout d'une heure et demie, l'attaque des tissus par les extraits ♂ est très intense: le cytoplasme et les membranes cellulaires ont presque entièrement disparu, et les noyaux apparaissent peu colorés sur fond clair; leurs contours sont attaqués, les nucléoles sont en voie de disparition (Fig. 16, 1).



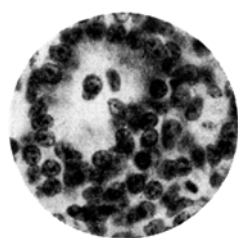
1



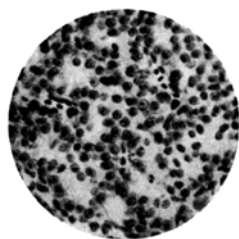
1



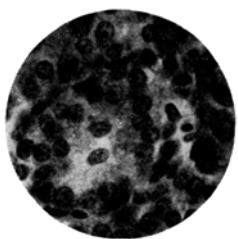
2



2



3



3

Fig. 16.

Fig. 17.

Fig. 16. Action des autolysats de canaux de MÜLLER mâles et femelles sur des coupes de pancréas embryonnaire. 1 Coupe soumise à l'autolysat de canaux mâles. 2 Coupe témoin, soumise au RINGER chloroformé. 3 Coupe soumise à l'autolysat femelle.

(D'après D. PFLEGER).

Fig. 17. Coupes de pancréas embryonnaire soumises aux autolysats de canaux de MÜLLER de sexe indifférencié. 1 Action de l'autolysat en présence de trans-déhydro-androstérone. 2 Action de l'autolysat seul (témoin). 3 Action de l'autolysat en présence d'acide doisylique.

(D'après D. PFLEGER).

Au contraire, les coupes soumises aux extraits ♀ sont beaucoup moins modifiées. Leur cytoplasme, un peu plus clair que celui des témoins (Fig. 16, 3) conserve la structure cellulaire, les noyaux demeurent intacts. Le même résultat est obtenu avec des autolysats de canaux de MÜLLER indifférents (♂ ou ♀) au 6<sup>e</sup> jour de l'incubation. Ce n'est donc pas avant le stade de la différenciation que les facteurs de l'autolyse accélérée apparaissent dans les canaux ♂.

Ainsi la preuve est faite qu'il existe, dans les canaux de MÜLLER ♂, prélevés après le stade de la différenciation sexuelle, des enzymes plus actifs que dans les canaux ♀. Cette différence d'activité résulte-t-elle de différences quantitatives ou qualitatives dans l'équipement enzymatique, ou bien de phénomènes d'activation ou d'inhibition? La question n'est pas encore résolue. PFLEGER aborde actuellement ces problèmes par différentes techniques biochimiques.

#### D. - Formation de l'enzyme *in vitro* sous l'influence d'une hormone ♂ cristallisée

Nous avons démontré plus haut (chap. II), que l'hormone ♂ est le *primum movens*<sup>1</sup> de la différenciation sexuelle des canaux de MÜLLER, c'est-à-dire de leur atrophie chez le ♂. L'enzyme qui joue un rôle actif dans leur régression *in vitro* n'est donc qu'un agent intermédiaire. Quelle est la relation entre l'hormone et la diastase? L'hormone suscite-t-elle directement la production de l'enzyme, ou celle-ci est-elle une réaction banale de l'organisme, consécutive à la nécrose cellulaire, provoquée, nous l'avons vu, par l'hormone? On se trouverait en présence d'une réaction de défense de l'organisme, d'une élimination de déchets, comme il s'en produit dans tout organisme supérieur, quand une accumulation de débris cellulaires provoque par exemple un afflux de leucocytes. Les enzymes accumulés au cours d'un tel processus continueraient simplement leur activité *in vitro*.

Les résultats récents de PFLEGER<sup>2</sup> permettent d'envisager une solution à ce problème. Nous avons vu que les autolysats de canaux de MÜLLER indifférenciés de moins de 8 jours et de canaux ♀ de plus de 8 jours n'ont qu'une faible activité enzymatique. Celle-ci est considérablement renforcée, si l'on met une hormone ♂ en présence du broyat pendant le temps habituel de la préparation de l'extrait (6 à 8 h d'autolyse). Les expériences sont conduites comme dans les expériences rapportées au paragraphe précédent.

Dans chaque expérience, trois coupes de pancréas sont soumises respectivement à l'action d'un autolysat simple de canal de MÜLLER indifférencié, d'un autolysat préparé en présence d'une hormone androgène, la trans-déhydro-androstérone, et d'un autolysat préparé

<sup>1</sup> Avec la restriction, déjà formulée, que la production des hormones est elle-même sous la dépendance des gènes sexuels.

<sup>2</sup> D. PFLEGER, C. r. Soc. Biol. 146, 932 (1952).

en présence d'une hormone ♀, le sel de sodium de l'acide n-bis-déhydrodoisynolique. En opérant dans ces conditions, on constate des différences systématiques entre les activités des trois catégories d'autolysats (Fig. 17). La trans-déhydro-androstérone active d'une manière intense l'attaque du cytoplasme et des noyaux, dont les nucléoles disparaissent entièrement (Fig. 17, 1). L'acide n-bis-déhydrodoisynolique inhibe par contre légèrement la digestion cytoplasmique, si bien que les coupes sont très peu attaquées (Fig. 17, 3).

On retrouve ainsi, en présence des hormones sexuelles ♂ et ♀, les mêmes images cytologiques qu'avec les autolysats de canaux de MÜLLER ♂ ou ♀; les différences sont encore plus accusées. On peut donc, en opérant *in vitro*, obtenir à volonté, à partir de canaux indifférenciés ou ♀, la même activité enzymatique qu'avec les canaux ♂, en ajoutant une hormone ♂ au broyat livré à une autolyse de quelques heures. Il convient d'ajouter que les solutions d'hormones pures n'ont aucune action par elles-mêmes et que les coupes qui leur sont soumises ne montrent aucune différence avec les témoins.

On peut conclure de ces résultats que les hormones sexuelles se montrent capables d'agir *directement* sur le système enzymatique des canaux de MÜLLER – soit qu'elles entraînent la production d'enzymes à partir des autolysats de canaux nécrosés, soit qu'elles fassent apparaître une substance qui favorise leur action (cas de la trans-déhydro-androstérone) ou qui l'inhibe (cas de l'acide doisynolique). L'activité diastasique que l'on observe dans les explants ♂ est donc la conséquence directe de l'imprégnation de ces organes par les hormones, et non d'une réaction banale de défense de l'organisme.

#### V. – RÉSULTATS DIVERS

D'autres facteurs que les hormones sexuelles ou leurs médiateurs jouent-ils un rôle dans le maintien ou l'atrophie des canaux de MÜLLER?

Parmi les recherches récentes effectuées dans d'autres laboratoires et qui concernent ce problème chez les oiseaux, il convient de signaler celles de STOLL<sup>1</sup> et de LEROY<sup>2</sup>.

STOLL a montré qu'en faisant incuber les œufs à une température anormale (40,5° à 41°) après 2, 5, 7 ou 8 jours, les canaux de MÜLLER persistent fréquemment chez les embryons mâles, le canal droit fait de même chez les embryons femelles. Des recherches encore inédites, faites dans mon laboratoire par SALZGEBER, ont tenté de préciser à quel stade et combien de temps la perturbation doit jouer pour être efficace. Il était déjà significatif dans le travail de STOLL que l'augmentation de température dût intervenir au plus tard à 8 jours. Mais STOLL soumettait les œufs à ces températures anormales pendant toute la suite de l'incubation. Les ex-

périences de SALZGEBER ont permis de resserrer l'encadrement dans lequel l'intervention est efficace: c'est *entre 7 et 10 jours* que l'augmentation de température détermine la persistance des canaux de MÜLLER. Cette période correspond précisément à la phase de début de la différenciation sexuelle des gonades.

Nous pensons que les résultats de STOLL rentrent dans le cadre de l'explication hormonale. Ils sont superposables à ceux que nous avons obtenus (Ét. WOLFF et Em. WOLFF<sup>1</sup>) dans nos expériences de castration. Il est vraisemblable que les températures élevées (de même que les basses températures dans des recherches plus anciennes) entraînent un trouble général du développement, attesté par la mortalité considérable des embryons incubés dans ces conditions. Ce trouble retentit sur les gonades en voie de différenciation sexuelle, dont la sécrétion normale serait inhibée: l'effet d'une température trop élevée reviendrait à une sorte de castration physiologique, à une insuffisance de la sécrétion hormonale.

LEROY a affirmé dans un travail récent<sup>2</sup> qu'une intervention traumatisante suffit à entraîner le maintien des canaux de MÜLLER chez l'embryon ♂. Il donne pour arguments des expériences de greffes coelomiques d'organes variés, qui auraient provoqué cet effet dans tous les cas, mais il ne donne aucune statistique de ses résultats. Il recourt à une explication dans laquelle les sécrétions de la cortico-surrénale sont mises en cause.

De tels résultats n'ont jamais été observés par les auteurs qui ont appliqué la technique des greffes coelomiques. Bien que l'interprétation de LEROY parût d'emblée suspecte, j'ai repris la question avec trois de mes collaborateurs, HAFEN, LUTZ-OSTERTAG et SALZGEBER. En aucun cas, sur un grand nombre d'expériences effectuées correctement, et quel que fût l'organe greffé, on n'a observé la persistance de canaux de MÜLLER ♂. Un seul cas, dans lequel l'atrophie ne s'est pas produite, était dû à une élévation accidentelle de la température, qui a pu être exactement contrôlée. Il n'est pas douteux qu'une cause d'erreur s'est introduite dans les expériences de LEROY – dont l'interprétation ne saurait être retenue. Elles n'apportent aucune contribution valable au problème.

#### VI. – DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il résulte des recherches que nous avons évoquées que la différenciation sexuelle des canaux de MÜLLER des oiseaux est due aux hormones sécrétées par les gonades embryonnaires. C'est l'hormone ♂ qui joue le rôle prépondérant. Elle entraîne l'atrophie des canaux de MÜLLER ♂, et des canaux des deux sexes soumis expérimentalement à son action. En milieu anormal, réalisé dans différentes conditions expérimentales,

<sup>1</sup> R. STOLL, Arch. Anat. micro. Morph. exp. 37, 333 (1948).

<sup>2</sup> P. LEROY, Rev. sci. 3301, 25 (1949); C. r. Soc. Biol. Paris 143, 1350 (1949).

<sup>1</sup> Ét. WOLFF et Em. WOLFF, J. Exp. Zool. 116, 59 (1951).

<sup>2</sup> P. LEROY, Rev. sci. 3301, 25 (1949); C. r. Soc. Biol. Paris 143, 1350 (1949).

ces organes ne régressent pas. Ils n'ont donc pas besoin d'hormone femelle pour se maintenir. L'hormone ♀ stimule leur développement ultérieur chez l'embryon ♀. S'ils subsistent dans un embryon ♂ ayant reçu des injections d'hormone ♀, c'est vraisemblablement par une action médiate sur le testicule dont le développement est inhibé ou par un effet protecteur de l'hormone ♀ vis-à-vis de l'action nécrosante de l'hormone ♂.

L'hormone ♂ est donc le facteur déterminant de la régression des canaux de MÜLLER. Si nous ignorons encore l'enchaînement par lequel les gènes sexuels déterminent l'élaboration de l'hormone des testicules embryonnaires, nous commençons à connaître les conditions dans lesquelles l'hormone mâle provoque cette atrophie. D'une part, elle entraîne la nécrose de leurs tissus, à la manière d'une substance toxique spécifique: seuls les canaux de MÜLLER sont lésés par l'hormone ♂, d'autres organes ne sont pas affectés par elle. D'autre part, elle détermine la production de diastases, ou elle active un système enzymatique, qui digère les tissus nécrosés. Ces deux effets – nécrose et autolyse – peuvent être reproduits *in vitro* sur des canaux explantés. La diastase (ou un élément qui l'active) peut être produite *in vitro* par action directe de l'hormone sur un autolysat de canaux, en l'absence de cellules vivantes. Ainsi l'hormone a une double action: une action directe sur les tissus qu'elle détruit, une action indirecte par diastase interposée, qui digère et fait disparaître les débris nécrosés.

On peut se demander quel est l'ordre de succession normal de ces phénomènes de nécrose et de digestion. L'action diastasique précède-t-elle et provoque-t-elle la nécrose, ou le processus est-il inverse? Il semble, d'après les données expérimentales et histologiques, que l'action diastasique s'exerce sur des cellules déjà nécrosées. On peut se demander dès lors si les phénomènes d'histolyse ne représentent pas une banale réaction de défense de l'organisme vis-à-vis de débris cellulaires, s'ils ne sont pas dus à un afflux de leucocytes qui sécrèteraient sur place les diastases appropriées. Ni l'aspect histologique du phénomène, ni les réactions chimiques *in vitro* ne permettent de justifier cette hypothèse. Le renforcement considérable de l'activité diastasique qu'on observe *in vitro* en présence d'hormone ♂ dans un autolysat quasi inactif démontre qu'il s'agit bien d'une propriété spécifique de l'hormone, et non d'une réaction banale de l'organisme. Il reste à savoir quelle est la nature des enzymes élaborées, quelles sont leurs propriétés, et la nature des produits de la dégradation des protéines qu'elles attaquent. En définitive, le mécanisme de la régression des canaux de MÜLLER peut être schématisé de la manière suivante (Fig. 18). En ce qui concerne l'évolution des canaux ♀ gauches, on remarquera que leur développement n'est pas subordonné à l'action de l'hormone ♀ pendant une partie de la vie embryonnaire. Sans doute le canal gauche réagit-il dans l'embryon et *in vitro* à l'apport

d'hormones femelles – sa croissance s'exalte sous leur influence. Il est déjà sensible à l'hormone femelle – mais celle-ci ne paraît pas indispensable à son développement initial.

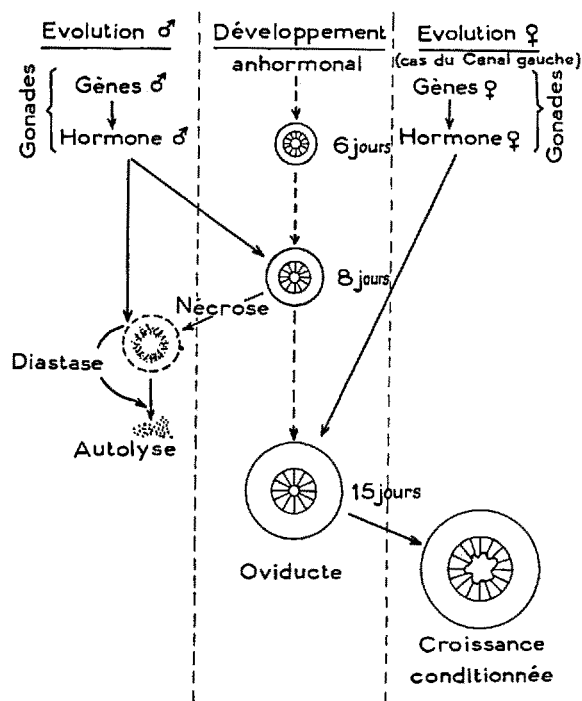


Fig. 18.

Ces remarques ne s'appliquent qu'au canal gauche – qui donnera le futur oviducte. Rappelons que le canal droit subit une atrophie progressive – plus lente et moins complète que celle des canaux ♂. On sait que cette régression se fait sous l'influence d'hormones sécrétées par les gonades femelles; le mécanisme de leur action, sans doute très analogue aux processus qui déterminent la régression des canaux ♂, n'a pas encore été élucidé.

Considérons maintenant le problème général de la régression des organes rudimentaires et demandons-nous quels enseignements les recherches sur les canaux de MÜLLER apportent à l'ensemble de la question. Nous apportons – pour la première fois peut-être – des indications précises sur le déterminisme physiologique de l'atrophie d'un organe. Ces explications peuvent-elles être étendues à d'autres phénomènes d'atrophie? Remarquons tout d'abord que nous avons employé indifféremment les termes d'*atrophie* et de *régression*. Ils s'appliquent aussi bien l'un que l'autre aux canaux de MÜLLER. Mais ils peuvent n'être pas équivalents dans d'autres cas, car il y a différentes formes d'organes rudimentaires.

Un organe peut rester rudimentaire parce qu'il s'arrête dans sa croissance – à un stade généralement précoce. L'atrophie est alors un phénomène relatif: l'organe ne «régresse» pas, il cesse de croître, il reste identique à lui-même, mais il donne l'impression de

rapetisser par rapport aux autres organes et à l'ensemble de l'organisme, qui se développent considérablement suivant des lois de croissance données.

Dans d'autres cas, un organe rudimentaire peut subir d'une part l'arrêt de croissance, d'autre part la régression, comme le font les canaux de MÜLLER. Encore faut-il distinguer entre les organes qui disparaissent complètement et ceux qui ne subissent qu'une régression partielle. Les canaux de MÜLLER offrent encore un remarquable exemple des deux modalités de cette deuxième catégorie. Ils disparaissent complètement chez le ♂, comme nous l'avons vu. Chez la ♀, le canal droit seul s'atrophie. Il subsiste un rudiment cloacal, qui paraît se stabiliser vers la fin de l'incubation. On pouvait se demander si cette atrophie n'est pas un simple arrêt de croissance, le canal restant égal à lui-même, tandis que le reste de l'embryon continue à se développer. Des mesures systématiques de longueur, effectuées récemment par LUTZ-OSTERTAG, des dosages d'azote total aux différents stades de la régression, effectués en même temps par PFLEGER, ont montré qu'il n'y a pas seulement un arrêt de développement, mais encore une régression notable, s'arrêtant à un certain stade.

Il est difficile de dire dans chaque cas particulier à quelle catégorie d'organe rudimentaire on a à faire, et à quelle modalité d'atrophie. Dans l'état actuel de nos connaissances, la régression n'est certaine que quand elle est complète. Dans de nombreux cas où il subsiste un rudiment, on manque de données précises pour pouvoir affirmer qu'un organe a réellement régressé. Signalons toutefois que les corps de WOLFF (mesonephros) sont le siège d'une importante régression au cours de la vie embryonnaire, ainsi que l'a montré HAFEN<sup>1</sup>. L'examen d'autres cas particuliers nous entraînerait au delà des limites de cet exposé. Que peut-on dire à l'heure actuelle de l'œil de taupe, de l'œil de protége, du bourgeon caudal de l'homme, de l'atrophie des doigts des Ongulés, de beaucoup d'exemples classiques et encore peu étudiés? Peu de choses précises, et rien sur la causalité de leur atrophie.

L'exemple des canaux de MÜLLER apporte des précisions sur un phénomène de régression proprement dite, où l'arrêt de croissance est suivi de nécrose et d'histolyse. Il donne un moyen d'aborder d'autres phénomènes de régression. Sans doute les hormones sexuelles n'y jouent pas un rôle général – mais d'autres hormones ou sécrétions peuvent intervenir. On entre-

voit le rôle que peuvent jouer certaines sécrétions humérales dans l'arrêt de développement, certaines substances toxiques d'origine interne dans la nécrose, et l'on peut imputer à la formation de diastases, suscitées dans l'organe par ces mêmes substances, l'élimination rapide des tissus dégénérés et la disparition plus ou moins complète d'un organe.

### Summary

(1) The regression of the Mullerian ducts in the avian embryo is considered as a particular case of the general problem of rudimentation of embryonic organs. This problem was approached with morphological, physiological and biochemical methods.

(2) The first difference between male and female ducts appears on the 9<sup>th</sup> day of incubation in the chick: the epithelium of the male ducts suddenly undergoes necrosis and disappears in this first phase of regression.

(3) The basic problem may be expressed by the following alternatives: Does the male embryo contain a factor promoting regression of the Mullerian ducts, or does the female one elaborate a substance which protects them against a spontaneous atrophy?

(4) Maintenance of the Mullerian ducts in male embryos was obtained with different methods: injections of female crystalline hormones, early castrations, explantations *in vitro* before the beginning of sex differentiation.

(5) Regression was obtained by injections of androgens, coelomic grafts of embryonic testes, associations of testes with undifferentiated ducts *in vitro*, or addition of androgens to the culture medium.

(6) When cultivated *in vitro* after the beginning of sex differentiation of the gonads, the male ducts regress, the female ducts survive and develop. Therefore, a factor determining retrogression is present in the male ducts and lacking in the female ducts at this stage. It depends on the male hormone which is secreted by the testes.

(7) Male hormones directly determine necrosis of the Mullerian ducts, and cause their disappearance by the way of proteolytic enzymes, whose presence was detected *in vitro* by ultra-microchemical and cytochemical methods. Androgens are able to activate *in vitro* inactive autolysates of undifferentiated female ducts. Evidence is therefore presented that the enzymes determining hydrolysis of the ducts are evoked or activated by a male hormone.

(8) Evidence is presented that it is possible to reproduce experimentally, *in vitro* as well as *in vivo*, some of the processes which are responsible for the atrophy of Mullerian ducts. The mechanism of retrogression, demonstrated in the particular case of the Mullerian ducts, could possibly be extended to other phenomena of embryonic regression. The present analysis may be considered as an approach to the general problem of rudimentation. Humoral factors, having toxic effects, and enzymatic activities evoked by these internal agents, might play an important rôle in each process of retrogression.

<sup>1</sup> K. HAFEN, C. r. Soc. Biol. Paris 145, 755 (1951).