

50376
1990
279

50376
1990
279

THESE

présentée à l'Université de Lille I
pour obtenir le grade de

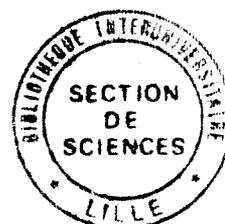
docteur de l'Université

en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Jean-Daniel LALAU

SEXUALISATION PERINATALE DE LA REPONSE CORTICOTROPE AU STRESS CHEZ LE RAT



soutenue le **20 décembre 1990**
devant la commission d'examen

Président

M. Dupouy J.P. Professeur à l'Université de Lille I

Examineurs

M. Aubert M.L. Professeur à l'Université de Genève
(*Rapporteur*)

M. Chatelain A. Professeur à l'Université de Lille I
(*Rapporteur*)

M. Fossati P. Professeur à l'Université de Lille II

M. Quichaud J. Professeur à l'Université de Picardie

AVANT-PROPOS

Je suis très heureux que **Monsieur J.P. DUPOUY**, Professeur de Physiologie à l'Université de Lille I, préside ce jury. Il m'a tout d'abord accueilli dans son laboratoire à Amiens et j'ai eu le plaisir de le suivre dans son nouveau laboratoire à Lille. Tout au long de mes années de recherche, Monsieur J.P. DUPOUY aura eu la patience de m'apprendre à expérimenter et, de par ses remarquables qualités d'enseignant, m'aura judicieusement guidé dans la rédaction de ce mémoire. Je tiens à le remercier très chaleureusement.

Je suis très honoré que **Monsieur M. AUBERT**, Professeur à la Faculté de Médecine de Genève, ait accepté de juger ce travail. Je voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sentiments très respectueux.

Je suis très heureux aussi que **Monsieur A. CHATELAIN**, Professeur de Physiologie à l'Université de Lille I, juge ce travail. Je retrouve ainsi la sympathique équipe que j'ai d'abord connue à Amiens où A. CHATELAIN a été Maître de conférences, équipe dans laquelle nous travaillions dans la meilleure des ambiances. Après l'hôpital, le laboratoire : petit havre de paix !

Je remercie **Monsieur P. FOSSATI**, Professeur d'Endocrinologie à l' Université de Lille II, de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse et lui témoigne mon profond respect.

Je remercie enfin **Monsieur J. QUICHAUD**, Professeur de Médecine Interne à l'Université de Picardie, de bien vouloir participer au jury de cette thèse. L'élève exprime à son maître sa fidélité et son grand respect.

A **Nathalie** : notre chemin, suite

A **Sandrine** (10 ans), **Charles-Edouard** (8 ans) et ... **Annabelle** (6 mois)

et je songe aux **rats**, les petits, les tout petits, les gros, les traités, les non traités...

Le chercheur, avant la thèse :

(à la manière de F. Kafka)

Il était tard. Une neige épaisse couvrait le domaine de la Recherche. La colline était cachée par la brume et la nuit ; nul rayon de lumière n'indiquait la direction. L. resta longtemps sur le pont qui menait de la grand-route au domaine, les yeux levés vers ces hauteurs qui semblaient vides. L'heure avançait.

Le chercheur, bien après la thèse :

(à la manière de M. Proust)

A l'âge quelque peu désabusé dont approche le chercheur et où l'on sait se contenter d'être amoureux de la recherche sans trop exiger de réciprocité, le rapprochement des esprits scientifiques, s'il n'est plus comme dans la première jeunesse le but vers lequel tend nécessairement le désir de recherche, lui reste uni en revanche par une association d'idée si forte -véritable trait d'union- qu'il peut en devenir la cause, s'il se présente avant lui.

Le présent travail a fait l'objet des publications et des communications suivantes :

PUBLICATIONS :

- J.P. DUPOUY, L. HARY, J.D. LALAU, I. GREGOIRE et A. CHATELAIN

Influence périnatale des hormones sexuelles sur l'activation différentielle de la fonction corticotrope au cours d'un stress chez le mâle et la femelle.

Ann. Endocrinol. 1987, **48** : 385-392.

- J.D. LALAU, M.L. AUBERT, D.F. CARMIGNAC, I. GREGOIRE et J.P. DUPOUY

Reduction in testicular function in rats. I. Reduction by a specific gonadotropin-releasing antagonist in fetal rats.

Neuroendocrinology 1990, **51** : 284-288.

- J.D. LALAU, M.L. AUBERT, D.F. CARMIGNAC, I. GREGOIRE et J.P. DUPOUY

Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats.

Neuroendocrinology 1990, **51** : 289-293.

- J.D. LALAU et J.P. DUPOUY

Inhibition of aromatase activity during pregnancy affects sex-related adrenocorticotrophic hormone release in response to ether-inhalation in juvenile rats.

Neurosci. Lett. 1990 (sous presse).

COMMUNICATIONS :

- J.P. DUPOUY, I. GREGOIRE et J.D. LALAU

Effets de la dexaméthasone et d'un anti-GnRH sur la testostérone du fœtus et du nouveau-né de rat.

54ème Réunion de l'Association des Physiologistes, Rennes, 27-30 mai 1986.

- J.P. DUPOUY, L. HARY, J.D. LALAU, I. GREGOIRE et A. CHATELAIN

Influence périnatale des hormones sexuelles sur l'activation différentielle de la fonction corticotrope au cours d'un stress chez le mâle et la femelle.

XVIème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Marseille, 11-13 septembre 1986.

- J.D. LALAU, M. AUBERT, D.F. CARMIGNAC, I. GREGOIRE et J.P. DUPOUY

Activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique chez le fœtus et le nouveau-né de rat : influence des glucocorticoïdes et d'un anti-GnRH.

XVIIème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lyon, 15-16 septembre 1987.

- J.D. LALAU et J.P. DUPOUY

Estradiol "defeminizes" the pituitary response to ether stress in the young rat.

Journées Internationales Henri-Pierre Klotz d'Endocrinologie Clinique, Paris, 26-27 mai 1988.

-SOMMAIRE-

Page

1. INTRODUCTION GENERALE	1
2. MATERIELS ET TECHNIQUES EXPERIMENTALES	4
2.1 Animaux	4
2.2 Stress à l'éther	4
2.3 Prélèvements sanguins et tissulaires	5
2.4 Présentation des résultats et analyses statistiques	5
3. INFLUENCE DU SEXE SUR LA REPOSE CORTICOTROPE AU STRESS A L'ETHER CHEZ LE RAT AGE DE 30 JOURS	6
3.1 Introduction	6
3.2 Protocoles expérimentaux	10
3.2.1 Traitement, à la naissance ou après la naissance, par l'œstradiol et/ou le clomifène	10
3.2.2 Préparation des surrénales et des plasmas pour le dosage de la corticostérone	11
3.2.3 Préparations des fragments d'hypothalamus et des lobes neuro-intermédiaires pour le dosage de l'AVP et de l'ocytocine	11
3.2.4 Chromatographie des plasmas sur gel	12
3.2.5 Dosage de la corticostérone par radiocompétition	13
3.2.6 Dosage radioimmunologique de l'ACTH	14
3.2.7 Dosage radioimmunologique de l'AVP et de l'ocytocine	15
3.3 Résultats	16
3.3.1 Taux plasmatiques de l'ACTH chez les animaux intacts	16
3.3.2 Taux plasmatiques de l'ACTH chez les animaux injectés, à la naissance ou après la naissance, par l'œstradiol et/ou le clomifène	17
3.3.3 Profil chromatographique de l'ACTH plasmatique chez les animaux intacts	18
3.3.4 Taux glandulaires et plasmatiques d'AVP et d'ocytocine chez les animaux intacts	19
3.4 Discussion	20
4. SECRETION PERINATALE DE TESTOSTERONE ET INFLUENCE D'UN ANTI-GnRH ET DE LA DEXAMETHASONE SUR L'AXE GONADOTROPE	25
4.1 Introduction	25
4.2 Protocoles expérimentaux	29
4.2.1 Etude des hormones de l'axe gonadotrope dans la période périnatale chez l'animal intact	29
4.2.2 Traitement des fœtus par un antagoniste de la GnRH et surrénalectomie des rates gravides	29
4.2.2.1 <i>Etude à différents stades de la gestation</i>	29
4.2.2.2 <i>Etude à 19 jours de gestation chez des rates surrénalectomisées</i>	29

	Page
4.2.3 Traitement des rates gravides et des rats nouveaux-nés par la dexaméthasone	30
4.2.3.1 <i>Traitement chronique des rates gravides</i>	30
4.2.3.2 <i>Traitement en aigu des rates gravides ou des nouveaux-nés</i>	30
4.2.4 Préparations des plasmas et des hypothalamus pour les dosages de testostérone, de LH et de GnRH.	31
4.2.5 Dosage radioimmunologique de la GnRH et de la LH	31
4.2.6 Dosage radioimmunologique de la testostérone	32
4.3 Résultats	32
4.3.1 Les hormones de l'axe gonadotrope chez l'animal intact	32
4.3.2 Influence de l'anti-GnRH sur les hormones de l'axe gonadotrope	33
4.3.2.1 <i>Etude à différents stades de la gestation</i>	33
4.3.2.2 <i>Etude à 19 jours de gestation chez des rates surrénalectomisées</i>	34
4.3.3 Influence de la dexaméthasone sur les hormones de l'axe gonadotrope	35
4.3.3.1 <i>Traitement chronique des rates gravides</i>	35
4.3.3.2 <i>Traitement en aigu des rates gravides ou des nouveaux-nés</i>	36
4.4 Discussion	38
4.4.1 Axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire chez les fœtus normaux	38
4.4.2 Influence de l'anti-GnRH	38
4.4.3 Influence de la dexaméthasone	40
5. INFLUENCE DE LA SECRETION FŒTALE DE TESTOSTE- RONE SUR LA REPOSE CORTICOTROPE AU STRESS A L'ETHER A L'AGE DE 30 JOURS	43
5.1 Introduction	43
5.2 Protocoles expérimentaux	44
5.2.1 Traitement des rates gravides par un inhibiteur de l'aromatase	44
5.2.2 Traitement des fœtus par l'oestradiol	45
5.2.3 Dosage radioimmunologique de l'ACTH	45
5.2.4 Dosage radioimmunologique de la testostérone et de l'oestradiol	45
5.3 Résultats	46
5.3.1 Effets de l'inhibiteur de l'aromatase	48
5.3.2 Effets de l'oestradiol	48
5.4 Discussion	49
6. DISCUSSION GENERALE	52
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59

1. Introduction générale

De nombreuses études ont montré que les stéroïdes sexuels jouent un rôle fondamental dans la différenciation anatomique et fonctionnelle des voies neuroendocriniennes impliquées dans le développement de la puberté, l'établissement du comportement sexuel adulte, et la mise en place du rétro-contrôle de la sécrétion des gonadostimulines hypophysaires (revues *in* GORSKI et WAGNER, 1965 ; ARNOLD et GORSKI, 1984). Le rôle de ces stéroïdes sur la sécrétion des autres peptides hypophysaires n'a fait l'objet, par contre, que d'un nombre très limité d'investigations.

Chez le rat, la réponse hypophysaire à un stress à l'éther, appréciée par la sécrétion d'ACTH et/ou de corticostérone, varie selon le sexe. Chez l'adulte, plusieurs équipes ont observé que la sécrétion de corticostérone (KITAY, 1961 ; LESCOAT et coll. 1970 ; LE MEVEL et coll. 1978 et 1979) et/ou d'ACTH (BARETT et coll. 1957 ; LE MEVEL et coll. 1978, 1979 et 1982) induite par un stress à l'éther est plus importante chez la femelle que chez le mâle. TANG et PHILLIPS (1977) et HARY et coll. (1981) ont noté l'existence de cette différence sexuelle de réponse respectivement dès le 7ème ou le 8ème jour de la vie postnatale : l'ACTHémie, qui s'élève très rapidement et de façon comparable dans les deux sexes juste après l'inhalation d'éther demeure, dans la demi-heure qui suit, plus élevée chez la femelle que chez le mâle (HARY et coll. 1981). Cette observation suggère que, chez le jeune rat, la mise en jeu des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse au stress à l'éther pourrait être modulée par les hormones sexuelles.

Les premiers jours de la vie extra-utérine constituent chez le rat une période critique du développement au cours de laquelle les androgènes vont orienter le futur comportement sexuel de l'adulte dans le sens mâle, conformément au sexe génétique (GORSKI et WAGNER, 1965 ; ARNOLD et GORSKI, 1984). Cet effet des androgènes est à mettre en relation avec une importante, mais fugace, élévation des taux plasmatiques de testostérone qui survient chez le mâle dans les 3 premières heures après la naissance (CORBIER et coll. 1978 ; SLOB et coll. 1980 ; GOGAN et coll. 1981 ; HARY et coll. 1986). La testostéronémie demeure ensuite bien plus élevée chez le mâle que chez la femelle au cours des cinq premiers jours de la vie (PANG et coll. 1979). Plusieurs arguments expérimentaux suggèrent que l'action de la testostérone sur la différenciation du comportement sexuel implique sa conversion en

œstradiol (GORSKI et WAGNER, 1965 ; RHODA et coll. 1984 ; ROSELLI et RESKO, 1984 ; ROSELLI et coll. 1984).

Chez le rat mâle, la castration à la naissance d'animaux délivrés à terme par césarienne supprime la brusque augmentation postnatale de la testostéronémie mais n'affecte pas la réponse de type mâle au stress à l'éther réalisé huit jours plus tard (HARY et coll. 1986) ; aussi, l'organisation fonctionnelle des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse hypophysaire au stress à l'éther pourrait s'établir au cours de la vie intra-utérine. Toutefois, à la naissance, les structures nerveuses sont encore sensibles à l'action masculinisante de la testostérone puisque l'administration sous-cutanée de testostérone à des femelles au moment de la naissance, à terme par césarienne, leur confère à l'âge de huit jours une réponse à l'inhalation d'éther de type mâle (HARY et coll. 1986).

La fonction corticotrope de l'hypophyse, tout comme la fonction gonadotrope, paraît donc susceptible d'être modulée par la sécrétion périnatale des androgènes.

Le but de ce travail a été de rechercher tout d'abord si la différence sexuelle dans la réponse au stress à l'éther, rapportée par HARY et coll. (1981) à l'âge de huit jours, est toujours présente chez le jeune rat à un stade plus tardif du développement. Le stade de 1 mois *postpartum* a été choisi car il peut offrir l'opportunité d'étudier plus facilement qu'à l'âge de 8 jours le déterminisme de la différence selon le sexe ; en outre, à ce stade, l'influence des stéroïdes sexuels est vraisemblablement la moindre, du fait d'une véritable dépression de la sécrétion gonadique prépubertaire.

Nous avons ensuite recherché si l'effet masculinisant de la testostérone sur la réponse hypophysaire à l'inhalation d'éther implique son aromatisation en œstradiol. Pour cela nous avons traité des femelles à la naissance par l'œstradiol et/ou un anti-œstrogène, le clomifène.

Nous avons enfin étudié l'influence éventuelle de la sécrétion fœtale de testostérone dans l'organisation fonctionnelle des structures impliquées dans la réponse hypophysaire au stress à l'éther. Cela impliquait d'étudier au préalable l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire chez le fœtus puis d'inhiber la sécrétion fœtale de testostérone, de contrecarrer ses effets, ou enfin, au contraire, de les

mimer. C'est ainsi que nous avons réalisé les expériences suivantes : un freinage de l'activité gonadotrope par un anti-GnRH ou par la dexaméthasone ; un traitement par un inhibiteur de l'aromatase ou par l'œstradiol, suivant l'hypothèse selon laquelle l'action de la testostérone pourrait impliquer sa conversion en œstradiol.

2. Matériels et techniques expérimentales

2.1 ANIMAUX

Les expériences ont été réalisées sur des rats blancs de souche Wistar élevés au laboratoire avec accès libre à la nourriture (granulés Labena B) et à l'eau. Dans l'animalerie, la température est maintenue à $23 \pm 1^\circ \text{C}$ et l'éclairage artificiel est assuré de 7 à 19 heures.

Pour la reproduction des animaux, cinq à six femelles sont mises en présence d'un mâle durant toute une nuit (de 18 à 8 heures). Le jour suivant est considéré comme le jour 0 de la gestation si des spermatozoïdes sont trouvés le matin dans le frottis vaginal. Les femelles gestantes sont transférées dans des cages individuelles 24 à 48 heures avant la naissance prévue. La gestation dure 21 jours. L'accouchement spontané survient en général dans la nuit du 21ème au 22ème jour. Le sevrage des animaux a été réalisé à 21 jours *postpartum*.

2.2 STRESS A L'ETHER

Les animaux, isolés dans des cages depuis au moins 24 heures avant le stress, ont été exposés à une inhalation d'éther pendant deux minutes puis sacrifiés par un coup sur la tête, soit juste à la fin de cette période (ce temps est considéré comme le **temps 0**), soit 30 minutes plus tard (**temps 30**). Les animaux qui n'ont pas été stressés ont servi de témoins ; ils ont été sacrifiés immédiatement après la sortie de leur cage par un coup sur la tête. On considère que ces témoins sont sacrifiés au **temps -2 minutes**.

Les animaux stressés sont placés dans un grand bocal de verre au fond duquel on a déposé du coton hydrophile imbibé de 10 ml d'éther à la température ambiante. Les animaux sont maintenus deux minutes dans ce bocal muni d'un couvercle (la durée de l'inhalation de l'éther a été volontairement limitée à 2 minutes en raison du risque important d'arrêt ventilatoire pour un laps de temps supérieur).

2.3 PRELEVEMENTS SANGUINS ET TISSULAIRES

Toutes les expériences ont été réalisées le matin entre 8 et 12 heures.

Le sang a été recueilli, après section des carotides et des jugulaires, dans des tubes contenant de l'EDTA à 5 % (Sigma, 2 μ l pour 100 μ l de sang) et de l'aprotinine (Zymofren^R, 10 unités, soit 1 μ l pour 100 μ l de sang) et placés dans la glace fondante. Après centrifugation (15 minutes à 3500 g et 4° C), le plasma est prélevé et congelé à -20 ou à -80 ° C jusqu'aux dosages.

Au cours de certaines expériences, les surrénales ont été prélevées par laparotomie, dégraissées, pesées, et stockées à -20° C.

Des fragments hypothalamiques incluant l'éminence médiane, délimités à l'avant par le chiasma optique et à l'arrière par les corps mammillaires, ont été rapidement prélevés après décapitation et ouverture de la boîte crânienne, plongés immédiatement dans de l'azote liquide, puis conservés à -80° C. Les hypophyses entières ont été disséquées sous loupe binoculaire à l'aide d'aiguilles d'acier afin de séparer les lobes antérieur et neuro-intermédiaire. Ces lobes ont été ensuite congelés à -80° C jusqu'aux dosages appropriés.

2.4 PRESENTATION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés par les moyennes accompagnées de l'erreur standard correspondante. Le nombre d'animaux étudiés, d'échantillons rassemblés ou de dosages effectués est signalé pour chaque expérience sur le tableau et/ou la figure correspondants.

Les comparaisons entre les groupes expérimentaux ont été réalisées à l'aide du test *t* de Student après avoir effectué une analyse de variance.

Les degrés de signification apparaissent sur les tableaux et les figures de la façon suivante : n.s. = non significatif ($p > 0,05$) ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

**3. Influence du sexe sur la réponse
corticotrope au stress à l'éther
chez le rat à l'âge de 30 jours**

3.1 INTRODUCTION

Chez le rat adulte, comme chez le jeune âgé de 7 ou 8 jours, une agression psychique ou systémique par inhalation d'éther entraîne une élévation de l'activité de type CRF (*corticotropin-releasing factor*) dans l'hypothalamus, de l'ACTHémie et de la corticostéronémie toujours plus forte et plus durable chez la femelle que chez le mâle (KITAY, 1961 ; GRAY, 1971 ; LESCOAT et coll. 1970 et 1971 ; TANG et PHILLIPS, 1977 ; HARY et coll. 1981). La castration, réalisée avant la puberté, réduit chez la femelle adulte ou augmente chez le mâle la sécrétion d'ACTH induite par un stress à l'éther. Ces effets sont corrigés par l'administration d'œstradiol ou de testostérone respectivement à la femelle et au mâle (KITAY, 1961 ; COYNE et KITAY, 1969 et 1971). La castration de l'animal adulte diminue l'amplitude de la sécrétion de corticostérone provoquée par un stress émotionnel chez la femelle mais non chez le mâle (LESCOAT et coll. 1971). A la naissance, enfin, l'orchidectomie induit une réponse surrénalienne au stress de type femelle chez l'animal âgé de 30 jours et augmente à 60 jours la réponse corticotrope à une agression neurotrope (LESCOAT, 1981 et 1984), tandis que l'ovariectomie induit une réponse corticotrope au stress de type mâle à 50 jours (MANIEY et coll. 1975).

Ces faits suggèrent que les stéroïdes sexuels jouent un rôle modulateur sur la fonction corticotrope. Le (les) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les stéroïdes sexuels pourraient influencer la fonction corticotrope n'est (ne sont) cependant pas encore bien élucidé(s). La différence de réponse corticotrope selon le sexe ne peut être expliquée, tout au moins chez le jeune, par une différence de la teneur hypophysaire en ACTH puisque, chez l'animal de 8 jours, les contenus en ACTH du lobe antérieur et du lobe neuro-intermédiaire sont comparables dans les deux sexes (HARY, communication personnelle). Chez l'adulte, au contraire, les teneurs en ACTH des deux lobes sont plus élevées chez le mâle (BERAUD, 1977). La différence sexuelle de réponse au stress pourrait résulter de la différence dans les taux circulants de corticostérone entre les deux sexes. En effet, les taux plasmatiques de corticostérone libre sont plus bas chez la femelle, du fait d'une teneur plus élevée du sang en CBG (*corticosteroid-binding globulin*, ou transcortine) et certains auteurs pensent que la sécrétion d'ACTH est, pour cette raison, moins

efficacement freinée par les corticostéroïdes chez la femelle que chez le mâle (ABE et CHRITCHLOW, 1977 ; LE MEVEL et coll. 1978 ; KELLERWOOD et DALLMAN, 1984). Les stéroïdes sexuels peuvent également exercer un effet sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien au niveau hypophysaire ou central, comme en témoignent les arguments suivants :

- en situation basale, l'ovariectomie réduit la sécrétion *in vitro* d'ACTH par des cellules isolées ou par des fragments de lobe antérieur d'hypophyse ; cet effet est corrigé par le traitement systémique par l'œstradiol. L'effet de l'ovariectomie serait dû à une diminution de la sensibilité hypophysaire au CRF et non à une diminution du contenu hypothalamique en CRF (COYNE et KITAY, 1969).

- divers œstrogènes et androgènes n'influencent pas directement, contrairement aux corticostéroïdes qui la diminuent, la sécrétion d'ACTH basale ou induite par un extrait hypothalamique (BUCKLINGHAM, 1982 ; SPINEDI et coll. 1988 ; HARY, 1990). Les œstrogènes potentialisent, par contre, la production de CRF induite par l'acétylcholine ou la 5-hydroxytryptamine, tandis que les corticostéroïdes l'inhibent (BUCKLINGHAM, 1982). D'autre part, le traitement par l'œstradiol réduit *in vitro*, chez la femelle ovariectomisée, la sécrétion d'ACTH induite par l'angiotensine II, que l'œstradiolémie soit, après traitement, à un niveau inférieur ou supérieur à celui de la rate intacte (SPINEDI et coll. 1988).

- la densité des cellules corticotropes, révélée par immunocytologie, est réduite par l'orchidectomie et restaurée par un traitement par la testostérone ; le traitement par l'œstradiol n'affecte pas cette densité, qui augmente par contre après ovariectomie (MALENDOWICZ et coll. 1987).

- enfin, l'implantation d'œstradiol dans l'hypothalamus (noyaux supra-optiques ou supra-chiasmatiques) ou dans l'éminence médiane augmente la taille des surrénales et la sécrétion de corticostérone, tandis que l'implantation de testostérone aux mêmes sites n'a pas d'effet (TELEGDY et coll. 1964).

Au sujet de l'action des hormones sexuelles circulantes sur la fonction corticotrope, outre ce qui vient d'être rappelé et qui concerne l'animal adulte, il convient de discuter l'influence de ces hormones dans les deux sexes au cours de la période périnatale. Les effets des hormones sexuelles sur la fonction corticotrope sont, en effet, à mettre en relation

avec une activation spontanée de l'axe gonadotrope qui survient chez le mâle pendant les 2 à 3 premières heures après la naissance spontanée ou par césarienne à terme. Le mâle fait donc l'objet d'une véritable "crise testiculaire", qui se caractérise par une brusque, mais éphémère, élévation de la testostéronémie et par une augmentation du poids des testicules (CORBIER et coll. 1978 et 1981 ; PANG et coll. 1979 ; SLOB et coll. 1980 ; GOGAN et coll. 1981 ; HABERT et PICON, 1984), précédées d'une décharge de LH dans le plasma (CORBIER et coll. 1978 ; ROFFI et coll. 1977) et d'un accroissement, tout aussi fugace, du contenu hypothalamique en GnRH (CORBIER et coll. 1981).

Cette période postnatale précoce est critique pour le développement ultérieur du nouveau-né dans la mesure où le pic de sécrétion de testostérone est un facteur déterminant pour l'apparition d'un comportement sexuel de type mâle, conforme au sexe génétique, à l'âge adulte (revue in ARNOLD et GORSKI, 1984). Il a été montré expérimentalement que la testostérone provoque la sexualisation du système nerveux central grâce à son aromatisation en œstradiol. En effet, l'élévation fugace de la testostéronémie chez le nouveau-né mâle s'accompagne d'une augmentation parallèle, tout aussi éphémère, du contenu hypothalamique en testostérone (CORBIER et coll. 1981) et en œstradiol (RHODA et coll. 1983 et 1984). L'orchidectomie à la naissance prévient ces modifications hormonales (RHODA et coll. 1984). Chez le nouveau-né femelle, qui ne connaît pas les variations sériques et hypothalamiques que nous venons de décrire chez le mâle, l'injection systémique de testostérone entraîne une augmentation du contenu hypothalamique en œstradiol (RHODA et coll. 1984). Par ailleurs l'incubation d'homogénats d'hypothalamus de nouveau-nés des deux sexes en présence d'androstènedione marquée au ^3H s'accompagne d'une formation d'œstrone tritiée (RHODA et coll. 1984). Un traitement de nouveau-nés femelles par l'œstradiol, administré par voie systémique ou intracrânienne, comme un traitement par la testostérone, perturbe profondément le comportement sexuel au stade adulte (revue in RHODA et coll. 1983). En effet, le traitement par l'œstradiol prévient, aussi efficacement que celui par la testostérone, l'établissement d'un comportement sexuel adulte de type féminin ainsi que l'ovulation.

Le cerveau contient des récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes (VITO et FOX, 1982). Une activité aromatasase responsable de la

conversion de la testostérone en œstradiol est présente dans l'hypothalamus (RAYNAUD et coll. 1971 ; REDDY et coll. 1974) et le système limbique des rats nouveau-nés mâles et femelles (REDDY et coll. 1974 ; LIEBERBURG et MAC EWEN, 1975 ; NAFTOLIN et coll. 1975). L'activité aromatasase de l'aire pré-optique de l'hypothalamus augmente chez le furet en période périnatale (TOBET et coll. 1985), tout comme chez le rat et la colombe adultes à la suite d'un traitement par la testostérone (ROSELLI et coll. 1984 ; HUTCHISON et STEIMER, 1986) ; la 5 α -dihydrotestostérone, qui est un androgène non aromatisable, n'a par contre pas d'effet stimulateur (HUTCHISON et STEIMER, 1986). Cet effet de la testostérone sur l'activité aromatasase a été observé dans les espèces animales citées ci-dessus après administration par voie générale (ROSELLI et coll. 1984 ; TOBET et coll. 1985 ; HUTCHISON et STEIMER, 1986) ou après implantation directe au niveau de l'aire pré-otique de l'hypothalamus (HUTCHISON et coll. 1986) ; il nécessite la liaison préalable de la testostérone aux récepteurs des androgènes puisqu'il est bloqué par le flutamide (ROSELLI et RESKO, 1984). Pour conclure concernant l'activité aromatasase, nous soulignerons qu'à la différence de ce que nous venons de rapporter chez le furet, cette activité ne varie pas chez les primates (le singe *Macaca mulatta* en particulier) en fonction du stade pré- ou postnatal (SHOLL et coll. 1989).

De nombreux arguments permettent d'attribuer à la "crise testiculaire" du nouveau-né un rôle majeur dans le processus de "masculinisation" ou de "déféminisation" des voies neuroendocriniennes impliquées chez l'adulte dans la fonction reproductrice (revue in ARNOLD et GORSKI, 1984). En effet, les androgènes testiculaires sécrétés dans la période périnatale déterminent, de façon définitive, le comportement sexuel de type mâle chez l'animal adulte. Par ailleurs, le traitement à la naissance de femelles par la testostérone prévient le comportement sexuel de type féminin (lordose) ainsi que l'ovulation ; la testostérone n'a plus ces effets si elle est administrée après le 10ème jour de la vie postnatale, même si l'administration est réalisée par voie intracérébrale. Fort peu d'études ont été consacrées, par contre, à la maturation postnatale d'autres voies neuroendocriniennes, telles que celles impliquées dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par un stress.

Dans un premier travail, nous avons tout-d'abord recherché si la différence sexuelle de réponse corticotrope au stress à l'éther observée dès 7-8 jours existe plus tardivement en période prépubertaire, à 30 jours. Nous avons ensuite recherché si l'effet de la testostérone implique son aromatisation en œstradiol au cours de la période périnatale. Pour tester cette dernière hypothèse, nous avons injecté de l'œstradiol et/ou un anti-œstrogène, le clomifène, à des femelles juste après la naissance puis étudié l'activation de la fonction corticotrope par une inhalation d'éther à l'âge de 30 jours. Nous avons pris comme critère d'activation du complexe hypothalamo-hypophysaire l'élévation de l'ACTHémie. Nous avons également dosé la vasopressine (AVP) et l'ocytocine dans la mesure où toutes deux potentialisent la sécrétion d'ACTH induite par le CRF (BENY et BAERTCHI, 1982 ; GILLIES et coll. 1982 ; TURKELSON et coll. 1982 ; GIBBS et coll. 1984 et 1986 ; REDEKOPP et coll. 1986), ceci afin de savoir si la sécrétion de ces hormones neurohypophysaires peut rendre compte, tout au moins en partie, de la différence sexuelle de la réponse corticotrope au stress à l'éther. Il a en effet été montré que les sécrétions d'AVP et d'ocytocine sont modulées par les hormones sexuelles : chez des rats adultes gonadectomisés, la testostérone inhibe la libération d'AVP alors que les œstrogènes l'augmentent (SKOWSKY et coll. 1979) ; par ailleurs, les androgènes inhibent la sécrétion d'ocytocine chez le rat (WILLIAMS et coll. 1985) tandis que les œstrogènes la stimulent chez la femme (AMICO et coll. 1981).

3.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

3.2.1 Traitement, à la naissance ou après la naissance, par l'œstradiol et/ou le clomifène

Des femelles âgées de un mois, nées à terme par césarienne, ont été confiées à des nourrices puis injectées, à différents moments après la naissance, d'œstradiol (100 µg) et/ou de clomifène (100 µg), sevrées à l'âge de 21 jours puis exposées à l'éther à l'âge de 30 jours selon le protocole précédemment défini. Les injections ont été réalisées par voie sous-cutanée soit immédiatement après la naissance, soit 7 à 12 heures après, soit 8 jours après. Des animaux intacts des deux sexes utilisés comme témoins ont été exposés à l'éther à l'âge d'un mois. La réponse

corticotrope au stress à l'éther a été appréciée par l'évolution temporelle de l'ACTH plasmatique et de la corticostérone surrénalienne et plasmatique. En outre, on a étudié les formes moléculaires de l'ACTH circulante dans le plasma et dosé les hormones neurohypophysaires (AVP et ocytocine).

3.2.2 Préparation des surrénales et des plasmas pour le dosage de la corticostérone

Après décongélation, les surrénales ont été broyées dans un tube en verre. Les broyats ont été transférés dans un tube en plastique contenant 5 ml de mélange NaCl à 0,9 %-alcool absolu (4/1, v/v) puis centrifugés.

3.2.3 Préparations des fragments d'hypothalamus et des lobes neuro-intermédiaires pour le dosage de l'AVP et de l'ocytocine

Après décongélation, les fragments hypothalamiques et les lobes neuro-intermédiaires ont été broyés et centrifugés 15 minutes à 4000 g à 4° C. L'AVP et l'ocytocine contenues dans les lobes neuro-intermédiaires et les portions d'hypothalamus ont été directement dosées dans le surnageant, sans extraction préalable.

Pour le dosage à partir du plasma, les deux hormones ont été extraites selon la technique de WILLIAMS et coll. (1985). Les échantillons sont acidifiés par l'acide formique 0,1 M (500/1500, v/v) puis injectés dans des cartouches chromatographiques Sep-Pak C18 (Waters). Après passage de l'échantillon, la cartouche est lavée par l'acide formique 0,1 M. Les hormones peptidiques retenues sont ensuite éluées par un mélange méthanol/acide formique 0,1 M (95/5, v/v) ou par le méthanol à 100 %. L'éluat est évaporé à 44° C (*Speed Vac concentrator*, Savant). Le résidu est dissous dans le tampon de dosage RIA ; si nécessaire le pH est ajusté à 7,40 avec NaOH 1N.

Les rendements d'extraction mesurés avec l'ocytocine marquée à l'¹²⁵I sont de 77,59 ± 2,43 % (n = 7) lors d'une élution par le mélange méthanol/acide formique et de 78,95 ± 2,54 % (n = 7) quand le méthanol pur est utilisé. Des rendements tout à fait comparables sont obtenus pour l'AVP marquée à l'¹²⁵I, ainsi que pour l'ocytocine et l'AVP froides ajoutées à du plasma.

3.2.4 Chromatographies des plasmas sur gel

Pour obtenir un volume suffisant (2 ml) de plasma à chromatographier, il a été nécessaire de rassembler plusieurs échantillons plasmatiques d'animaux d'un même groupe expérimental. Les échantillons ont été chromatographiés en chambre froide à 4° C sur des colonnes (60 x 0,9 cm) de Sephadex G-50 *fine* (Pharmacia) équilibrées et éluées avec de l'acide formique à 1 % (Merck). Des fractions de 1 ml ont été recueillies avec un débit constant de 10 à 11 ml/h à l'aide d'une pompe (*Peristaltic Pump*, Pharmacia) et d'un collecteur de fraction (MC 80, Jouan). A chaque fraction recueillie, on a ajouté 10 ml de mannitol à 10 %, pour faciliter la reconstitution ultérieure des éluats lors de la procédure d'extraction qui précède le dosage radioimmunologique de l'ACTH. Après agitation, les tubes ont été stockés à -20° C. Après décongélation des différentes fractions du chromatogramme, l'acide formique a été évaporé sous vide à 40° C grâce au système "*Speed Vac concentrator*" (Savant). Le résidu d'évaporation de chaque tube a été ensuite dissous dans 0,610 ml de tampon véronal 0,02 M, pH 8,2, contenant 0,3 % de HSA (sérum albumine humaine, Centre de Transfusion Sanguine de Marseille, 0,3 ml/100 ml, v/v), 0,2 % de mercaptoéthanol (Sigma, 0,2 ml/100 ml, v/v) et 0,1 % de rouge phénol (Mérieux, 20 µl/100 ml) destiné à indiquer le pH. Après agitation des tubes en chambre froide, le pH est ajusté si nécessaire à 8,2 avec NaOH 5 N.

La concentration de l'ACTH dans les éluats de chromatographie a été déterminée par dosage radioimmunologique selon la méthode de CHATELAIN et coll. (1980) développée ci-dessous. Les quantités d'ACTH sont exprimées en pg/ml ; l'ACTH₁₋₃₉ humaine de synthèse (Ciba-Geigy) étant utilisée comme standard de référence. L'estimation du poids moléculaire apparent des formes de l'ACTH présentes dans les éluogrammes a été faite grâce à des marqueurs de poids moléculaires connus passés sur les mêmes colonnes de Sephadex G-50 *fine* que celles utilisées pour les plasmas.

Les coefficients de partage (K_{av}) des différents marqueurs sont calculés selon l'équation suivante :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{où,}$$

- K_{av} = coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel,
- V_0 = volume vide de la colonne, déterminé par le volume d'élution du bleu Dextran 2000,
- V_t = volume total de la colonne remplie de gel,
- V_e = volume d'élution du marqueur de référence ou de l'ACTH.

3.2.5 Dosage de la corticostérone par radiocompétition

La corticostérone a été dosée par radiocompétition. Le dosage a été réalisé en double exemplaire sur des fraction aliquotes de 50 μ l pour les extraits surrenaliens et de 20 ou 50 μ l pour les plasmas, respectivement selon que les échantillons provenaient d'animaux stressés ou non stressés. Le volume des échantillons a été complété à 200 μ l par de l'eau distillée. Ceux-ci ont été ensuite délipidés avec 500 μ l d'iso-octane (Merck). Après centrifugation puis congélation de la phase aqueuse, la phase organique surnageante a été aspirée à la trompe à vide. La corticostérone a été extraite de la phase aqueuse décongelée par 2 ml d'acétate d'éthyle (Merck). Après une incubation de 30 minutes à 37° C sous agitation pour libérer la corticostérone liée aux protéines (la CBG en particulier) puis une nouvelle centrifugation, 1 ml de surnageant a été récupéré dans un tube de verre. Le rendement d'extraction de la corticostérone contenue dans les échantillons est supérieur à 90 %. Parallèlement, une gamme standard de corticostérone (Sigma) a été réalisée dans de l'acétate d'éthyle. Ce dernier présent dans les tubes de la gamme et des échantillons a été évaporé sous un courant d'azote à 37° C. Dans chaque tube sec, on a ajouté 1 ml de solution de transcortine (plasma de rates surrenalectomisées depuis 10 jours, dilué à 0,035 % dans le milieu du dosage) et de corticostérone marquée au tritium

(1,2,6,7,³H - corticostérone, Amersham, activité spécifique : 103 Ci/mmol), conservée à - 20° C dans du méthanol. Les études préliminaires ont montré que cette dilution du plasma riche en transcortine était optimale (liaison totale en l'absence de compétition : $66,1 \pm 1,2 \%$, n = 24). Après deux incubations successives de 20 minutes chacune, d'abord à 37° C puis dans la glace fondante, la corticostérone libre a été séparée de la corticostérone liée à la transcortine par adsorption sur 40 mg de Florisil (Sigma). Après une rapide agitation au vortex et une centrifugation de 15 minutes à 4° C, 50 µl de surnageant ont été prélevés et ajoutés à 5 ml de liquide scintillant (*Aqualuma*, Kontron). La variation intra-essai est de 1,7 % (n = 10) et la variation inter-essai est de 7,5 % (n = 7).

3.2.6 Dosage radioimmunologique de l'ACTH

Le dosage radioimmunologique de l'ACTH plasmatique a été réalisé sans extraction préalable à l'aide d'un kit commercialisé par le Commissariat à l'Energie Atomique (ACTH-IPR, Saclay, France). Les taux d'ACTH sont exprimés en pg/ml, l'ACTH₁₋₃₉ humaine étant utilisée comme standard de référence.

Le dosage de l'ACTH dans les éluats de plasma chromatographiés sur Sephadex G-50 *fine* ont été réalisés selon une technique développée dans le laboratoire (CHATELAIN et coll. 1980). L'ACTH synthétique humaine est marquée à l'iode 125 (Na¹²⁵I, IMS 30, Amersham, Angleterre). L'antisérum (gracieusement fourni par le Dr C. Oliver, Marseille) a été dilué au 1/500.000ème dans du tampon véronal 0,02 M, pH 8,2, additionné de 0,2 % de mercaptoéthanol et de 0,3 % d'albumine sérique humaine. Aucun croisement n'a été observé avec les hormones mélanotropes (α -MSH, β -MSH), lipotrope (β -LPH), le CLIP (*corticotropin-like intermediate-lobe peptide*) ou les fragments 4-10, 11-24, et 25-39 de l'ACTH porcine. Le pourcentage de croisement est de 100 % avec l'ACTH₁₋₃₉ humaine mais seulement de 40 % et 20 % respectivement pour les fragments 1-24 et 1-16 de l'ACTH. Après 2 jours d'incubation à 4° C, la séparation de l'ACTH liée à l'anticorps et de l'ACTH libre est réalisée à l'aide de 0,4 ml d'une suspension d'un mélange charbon actif-dextran (500 mg de charbon actif, Sigma, et 50 mg de dextran, *Clinical Grade*, Sigma) dans 100 ml de tampon véronal 0,02 M, pH 8,2. Le pourcentage de liaison en l'absence de compétition est de $44,6 \pm 1,6 \%$ (n =

78). Les concentrations d'ACTH sont déterminées à partir d'une courbe standard qui représente le pourcentage de liaison de l'ACTH en fonction de sa concentration. Cette courbe est linéarisée selon un modèle Logit - log (méthode des moindres carrés). La limite de détection est de 20 pg/ml de plasma. La variabilité intra-essai est de 3,22 % (n = 18) et celle inter-essai de 9,62 % (n = 15).

3.2.7 Dosage radioimmunologique de l'AVP et de l'ocytocine

Les immunsérums anti-vasopressine et anti-ocytocine ont été gracieusement fournis par le Dr P. CZERNICHOW (Hôpital Necker, Paris).

Le sérum anti-AVP a été dilué au 1/200.000ème et l'AVP marquée à l'iode 125 (*NEN Research Products*, Angleterre ; réf. NET 800 ; 67,7 Ci/mmol) a été utilisée comme traceur. Le tampon d'incubation utilisé est un tampon phosphate 0,05 M additionné de NaCl (0,15 M) et d'albumine sérique humaine (0,2 %) à pH 7,40. Après 48 heures de préincubation à 4° C sans AVP marquée et 14 heures d'incubation avec l'¹²⁵I-AVP, la séparation des formes libre et liée de l'AVP a été réalisée en présence de tampon phosphate 0,022 M, pH 8,40, de plasma de rat et de polyéthylène glycol 6000 (Merck, 95/5/25 ; v/v/p).

Le sérum anti-AVP croise à 100 % avec l'AVP et à 0,0049 % avec l'ocytocine. Dans nos conditions expérimentales la liaison spécifique de l'¹²⁵I-AVP a été de $49,83 \pm 2,02$ % (n = 26). La variation intra-essai est de 6,23 % (n = 10) et celle inter-essai de 7,81% (n = 12).

Le sérum anti-ocytocine a été dilué au 1/25.000ème ; le traceur utilisé est l'ocytocine marquée à l'¹²⁵I (*NEN Research Products*, Angleterre ; réf. NET 858 ; 39,3 Ci/mmol). Les séquences de préincubation, d'incubation et de séparation sont identiques à celles mentionnées pour l'AVP.

Le sérum anti-ocytocine croise à 100 % avec l'ocytocine et à 0,012 % avec l'AVP. La liaison spécifique est de $30,50 \pm 1,33$ % (n = 29). Les variations intra-essai et inter-essai sont respectivement de 4,95 % (n = 10) et de 5,69% (n = 17).

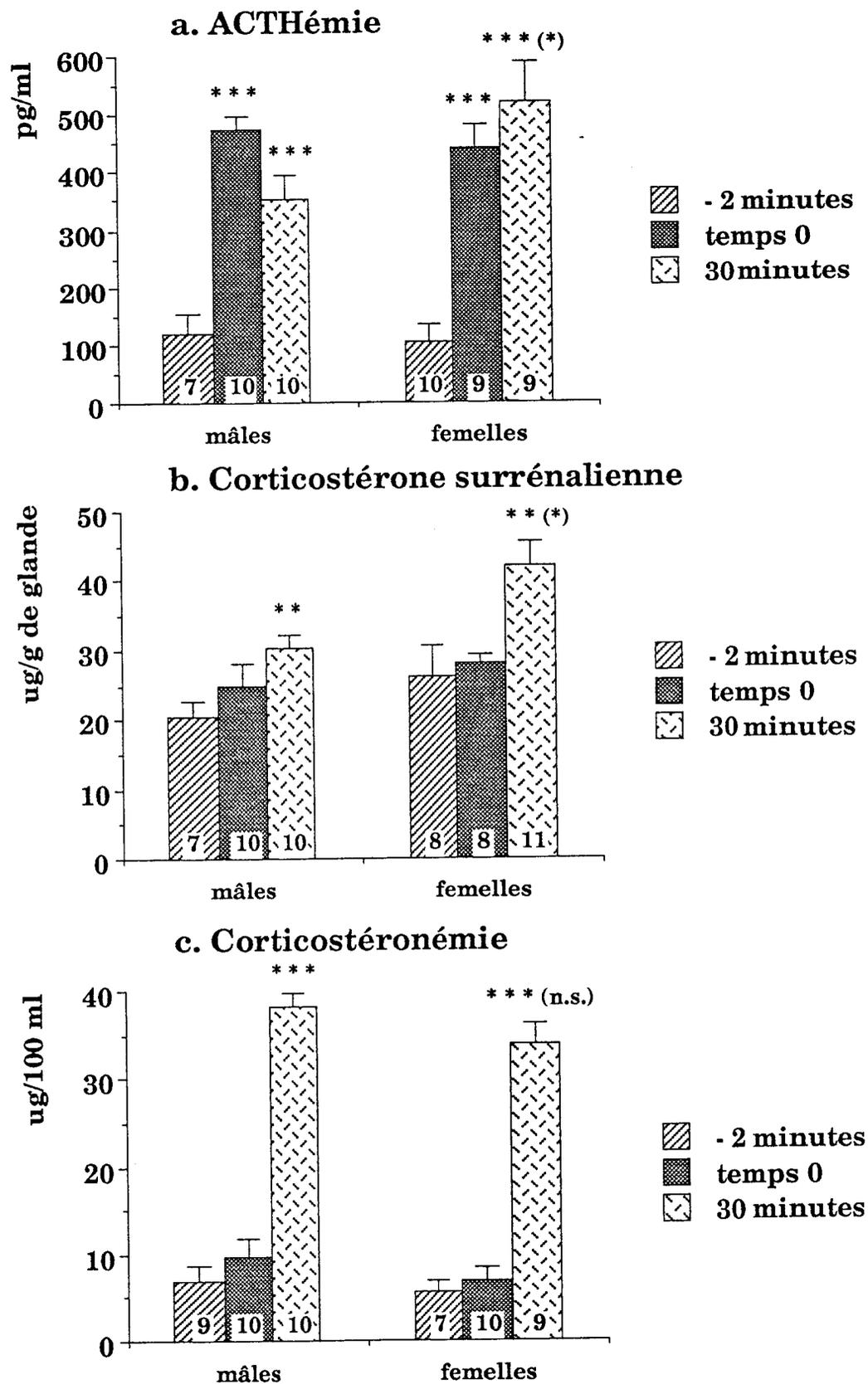


Fig. 1: ACTHémie (a), corticostérone surrénalienne (b) et plasmatique (c) des animaux mâles et femelles intacts, soumis à une inhalation d'éther à l'âge d'1 mois. Les prélèvements sont effectués juste avant (-2 minutes), juste après (temps 0), ou 30 minutes après la fin de l'inhalation d'éther.

Comparaison vs "-2 minutes": ** (p < 0,01) et *** (p < 0,001)

Comparaison vs les mâles à 30 minutes: (n.s.) (p > 0,05) et (*) (p > 0,05)

3.3 RESULTATS

3.3.1 Taux plasmatiques de l'ACTH chez les animaux intacts

A l'état de repos, avant le stress à l'éther, on n'observe pas de différence significative entre mâles et femelles pour l'ACTHémie, le poids des surrénales, la teneur des surrénales en corticostérone et la corticostéronémie (Tableau I & figure 1).

Tableau I. ACTHémie, poids des surrénales, corticostérone surrénalienne et corticostéronémie chez les animaux âgés de un mois, soumis ou non à une inhalation d'éther.

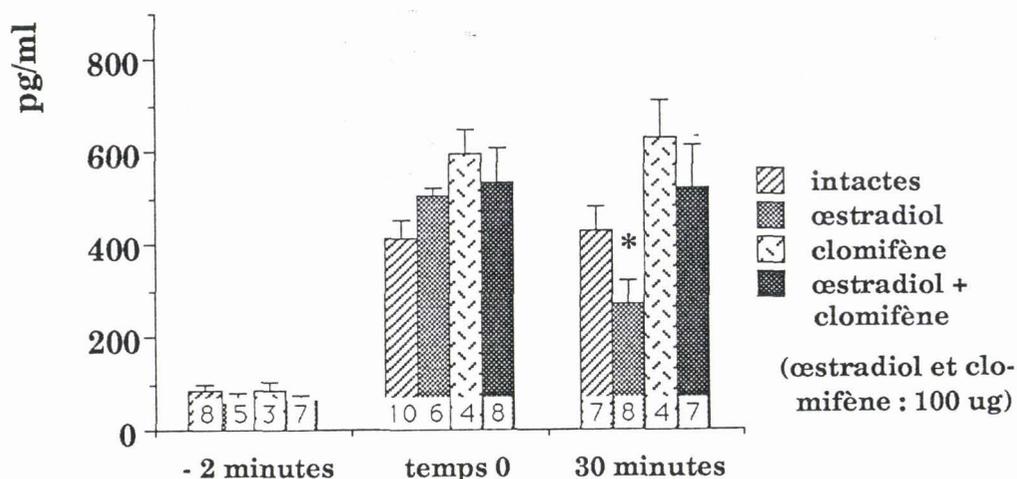
	temps - 2 minutes		temps 0		temps 30 minutes	
	mâles	femelles	mâles	femelles	mâles	femelles
ACTHémie, pg/ml	120 ± 34	105 ± 27 (n.s.)	472 ± 24 ***	440 ± 42 *** (n.s.)	351 ± 41 ***	521 ± 66 *** (*)
Poids des surrénales, g	31,6 ± 1,4	30,6 ± 1,5 (n.s.)	28,2 ± 1,4 n.s.	32,9 ± 1,6 n.s. (n.s.)	29,8 ± 0,6 n.s.	28,2 ± 2,1 n.s. (n.s.)
Corticostérone surrénalienne, ug/g	20,3 ± 2,1	26,2 ± 4,3 (n.s.)	24,9 ± 3,2 n.s.	28,0 ± 1,2 n.s. (n.s.)	30,2 ± 2,1 ***	43,4 ± 2,0 ** (n.s.)
Corticostéronémie, ug/100 ml	6,9 ± 1,7	5,5 ± 1,4 (n.s.)	9,6 ± 2,2 n.s.	7,0 ± 2,2 n.s. (n.s.)	38,2 ± 1,5 ***	35,4 ± 3,8 *** (n.s.)

comparaison vs temps - 2 minutes : n.s. (p > 0,05), ** (p < 0,01) et *** (p < 0,001).

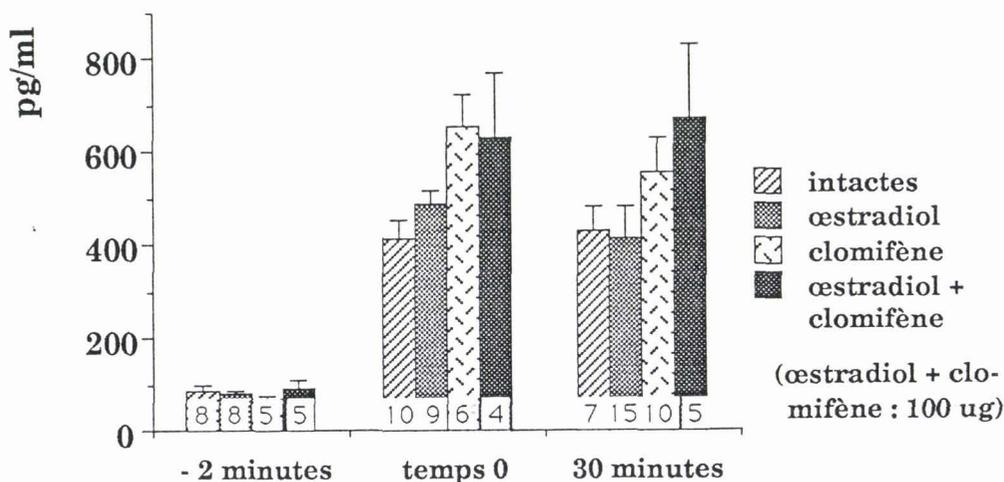
comparaison vs les mâles : (n.s.) (p > 0,05) et (*) (p < 0,05).

A la fin de la période d'inhalation d'éther, l'ACTHémie augmente fortement et de manière semblable dans les deux sexes (Tableau I & figure 1a) ; 30 minutes plus tard, l'ACTHémie décroît chez les mâles alors qu'elle demeure élevée chez les femelles (Tableau I & figure 1a). L'inhalation d'éther s'accompagne d'une élévation significative de la teneur des surrénales en corticostérone et surtout de la corticostéronémie (figure 1a). Trente minutes après le stress, la réponse au niveau des surrénales est plus importante chez les femelles que chez les mâles (Tableau I & figures 1b et 1c).

a. Femelles traitées à la naissance



b. Femelles traitées 7 à 12 h après la naissance



c. Femelles traitées 8 j après la naissance

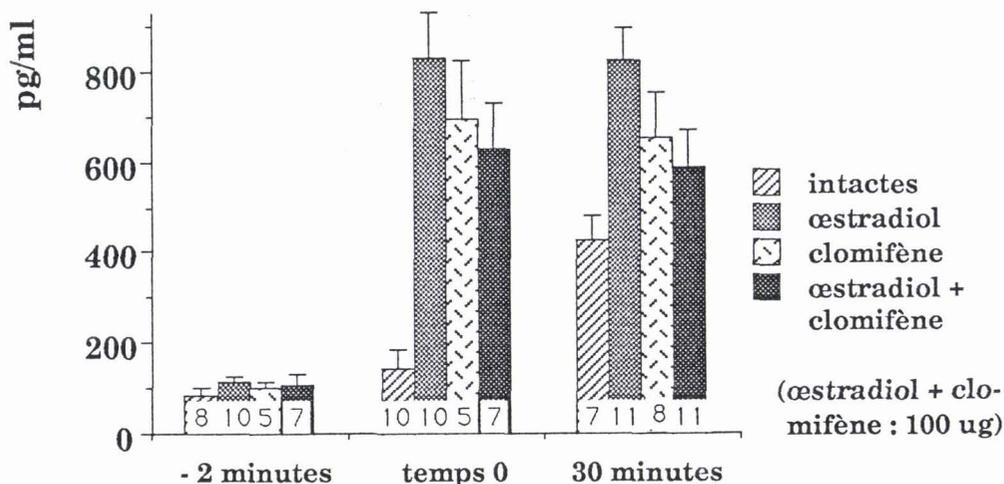


Fig. 2 : ACTHémie des animaux femelles de mêmes portées qui ont subi un stress à l'éther pendant 2 minutes à l'âge de un mois. Ces jeunes rates étaient intactes ou injectées à différents moments après la naissance : immédiatement après (a), 7 à 8 h après (b) ou 8 j après (c), d'œstradiol (100 µg), de clomifène (100 µg), ou d'œstradiol et de clomifène. Les prélèvements sanguins ont effectués juste avant (-2 minutes), juste après (temps 0), ou 30 minutes après la fin de la période d'inhalation d'éther.

Comparaison vs les animaux injectés d'œstradiol : * ($p < 0,05$)

3.3.2 Taux plasmatiques de l'ACTH chez les animaux injectés, à la naissance ou après la naissance, par l'œstradiol et/ou le clomifène

Chez les rats femelles injectés d'œstradiol et/ou de clomifène immédiatement après la naissance par césarienne, l'ACTHémie avant et juste après l'inhalation d'éther est comparable dans les trois groupes ainsi traités à celle des femelles intactes (**figure 2a**). Par contre, 30 minutes après la fin de l'inhalation d'éther, l'ACTHémie est significativement plus basse ($p < 0,05$) qu'au temps 0 chez les femelles traitées par l'œstradiol. Ceci n'est pas observé lorsque les animaux ont reçu à la fois de l'œstradiol et du clomifène ; ce dernier, administré seul, ne modifie pas la réponse chez les femelles (**figure 2a**).

Chez les femelles traitées par l'œstradiol et/ou le clomifène 7 à 12 heures après la naissance, les résultats vont dans le même sens que les précédents ; toutefois, si on note chez les animaux injectés d'œstradiol une tendance à la baisse de l'ACTHémie entre 0 et 30 minutes, cette baisse n'est pas significativement plus basse (**figure 2b**).

Chez les femelles traitées par l'œstradiol 8 jours après la naissance, l'ACTHémie est comparable aux temps 0 et 30 minutes (**figure 2c**).

3.3.3 Profil chromatographique de l'ACTH plasmatique chez les animaux intacts

L'analyse chromatographique des plasmas d'animaux mâles et femelles stressés, réalisée sur colonne de Sephadex G-50 *fine*, met en évidence la sécrétion quasi exclusive d'une seule forme moléculaire dont le volume d'élu-tion (**figure 3**), comme le poids moléculaire apparent (**figure 4**), sont très voisins de ceux de l'ACTH₁₋₃₉ humaine synthétique (**figure 3**). L' ACTH circulante est donc de type "little ".

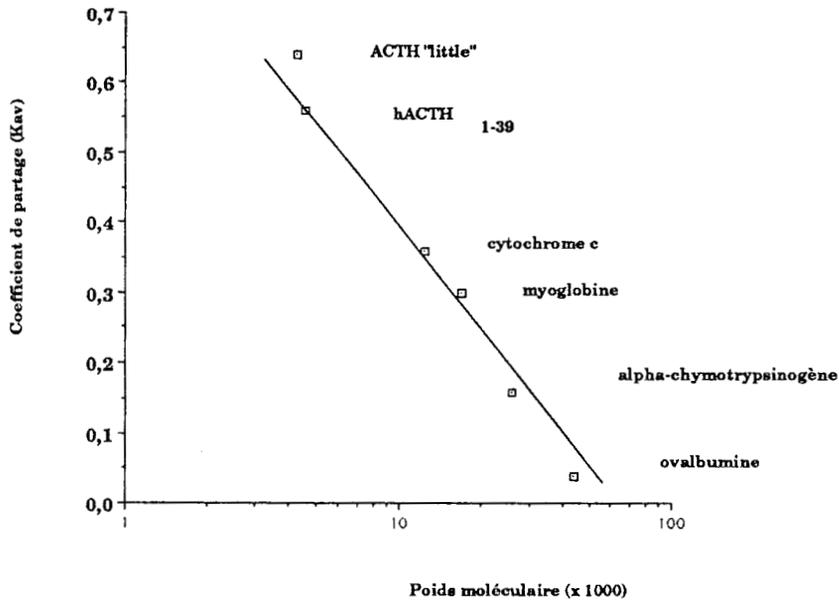


Fig. 3 : Exemple de chromatographie d'un échantillon plasmatique chez un rat mâle âgé de un mois et sacrifié immédiatement après la période d'inhalation d'éther. La colonne de Sephadex G-50 *fine* a été calibrée avec du bleu Dextran 2000 pour déterminer V_0 et de l'ACTH₁₋₃₉ humaine de synthèse.

Chromatographie de l'ACTH plasmatique

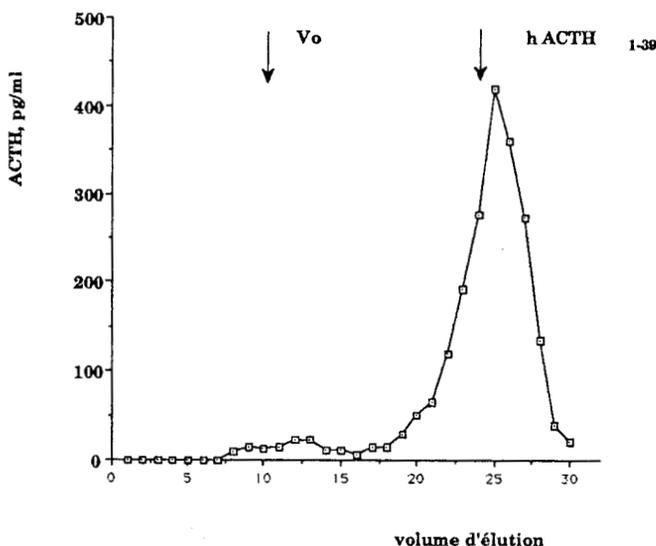
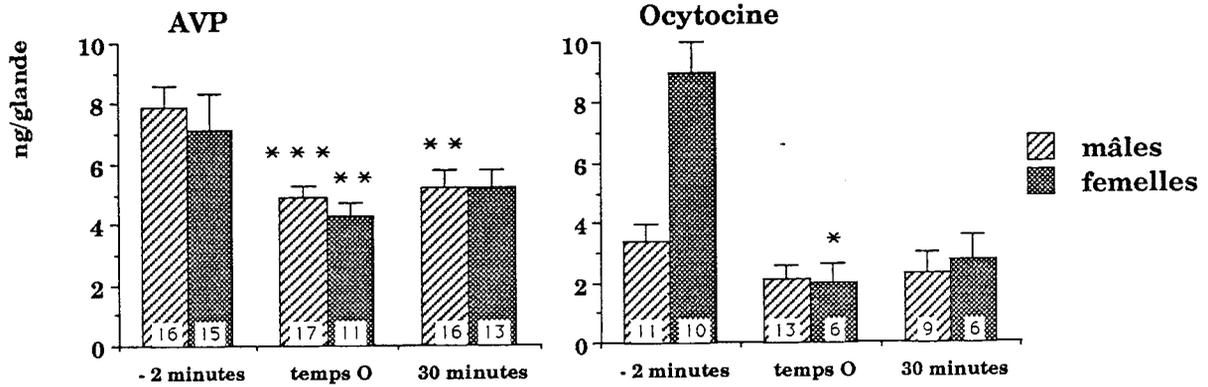
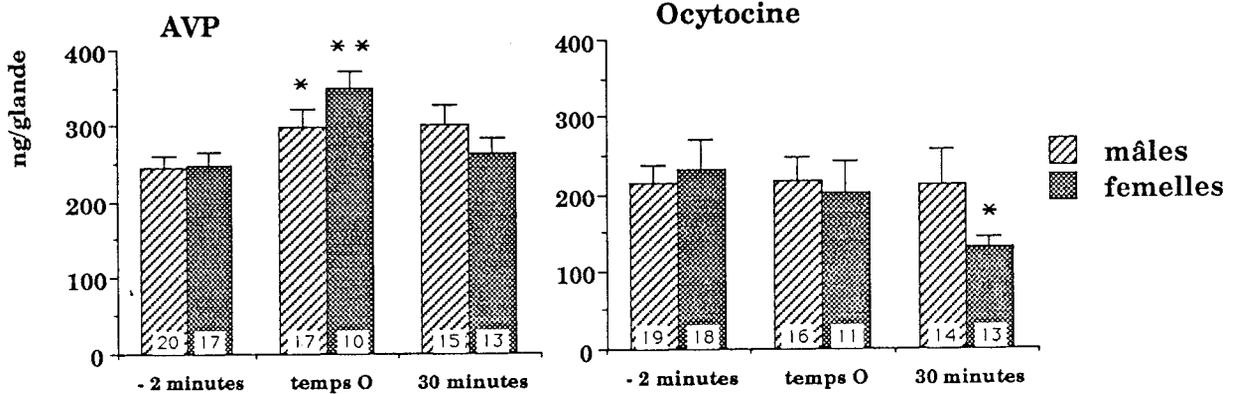


Fig. 4 : Estimation du poids moléculaire apparent de la forme moléculaire de l'ACTH présente dans les échantillons plasmatiques d'animaux stressés (filtration sur colonne de Sephadex G-50 *fine*).

a. Hypothalamus



b. Lobe neuro-intermédiaire



c. Plasma

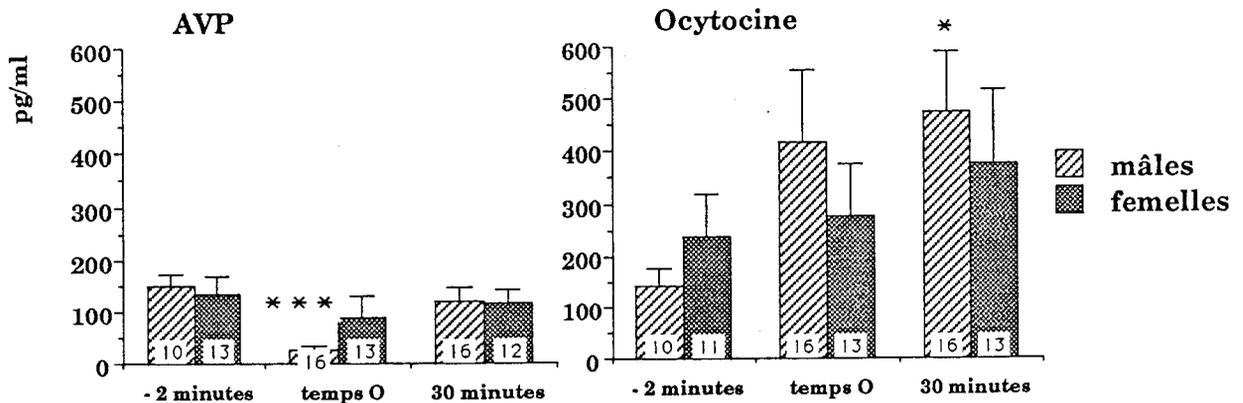


Fig. 5 : Teneurs de l'hypothalamus (a) et du lobe neurointermédiaire de l'hypophyse (b) et concentrations plasmatiques (c) en AVP et en oxytocine chez des animaux intacts soumis à une inhalation d'éther à l'âge de un mois.

Comparaison *vs* "temps -2 minutes" (seules les différences significatives sont indiquées) :

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) et *** ($p < 0,001$).

3.3.4 Taux glandulaires et plasmatiques d'AVP et d'ocytocine chez les animaux intacts

Le contenu de l'hypothalamus en AVP et en ocytocine est significativement diminué dans les deux sexes après l'inhalation d'éther (**figure 5a**). Le contenu du lobe neuro-intermédiaire en AVP est par contre significativement augmenté à la fin de la période d'inhalation d'éther ; celui en ocytocine ne varie pas chez le mâle mais est plus bas chez la femelle (**figure 5b**). Dans le plasma, la concentration en AVP est plus basse ou tend à être plus basse après le stress, en particulier au temps 0 chez le mâle ; celle d'ocytocine est plus élevée ou tend à être plus élevée, en particulier au temps 30 chez le mâle (**figure 5c**).

Il n'existe cependant pas de différence significative entre les deux sexes pour les taux glandulaires et plasmatiques d'AVP et d'ocytocine avant le stress où à la suite de l'inhalation d'éther.

3.4 DISCUSSION

L'élévation de l'ACTHémie, qui traduit une stimulation de l'axe corticotrope est, à la suite d'un stress à l'éther, plus durable chez les femelles que chez les mâles. Cette différence entre les deux sexes, observée à l'âge de un mois, existe déjà chez les nouveau-nés de 8 jours (HARY et coll. 1981). Dès 1977, TANG et PHILLIPS, en utilisant une méthode biologique de dosage de l'ACTH, avaient noté une réponse à un stress à l'éther de 2,5 ou 15 minutes chez le nouveau-né femelle de 7 jours, mais non chez le mâle. Chez ce dernier, l'absence apparente de réponse peut vraisemblablement s'expliquer par une ACTHémie beaucoup trop faible pour être mesurable par la méthode biologique de dosage utilisée, dont la sensibilité est moindre que celle de la méthode radioimmunologique mise en œuvre par HARY et coll. (1981). L'ACTH détectée par radioimmunologie dans le plasma est, par ailleurs, sous une forme biologiquement active, comme en témoignent, d'une part l'élévation de la corticostéronémie sous l'effet du stress et d'autre part la mise en évidence par chromatographie sur colonne de Sephadex G-50 *fine* d'une seule forme moléculaire de l'ACTH circulante. Celle-ci, co-éluée avec l'ACTH₁₋₃₉ humaine, est de type "*little*". Cette forme moléculaire présente une grande activité biologique (CHATELAIN et CHEONG, 1987), contrairement à la forme "*big*" éluée plus rapidement, abondante dans les lobes antérieur et neuro-intermédiaire de l'hypophyse fœtale et dans le plasma du fœtus mais non dans celui de l'adulte (CHATELAIN et CHEONG, 1986).

Chez le rat adulte, la réponse hypophysaire au stress à l'éther, appréciée par l'évolution temporelle de la corticostéronémie, est également plus importante chez la femelle que chez le mâle (KITAY, 1961 ; LESCOAT et coll. 1970 et 1971 ; GRAY, 1971). Chez nos animaux âgés de un mois, la différence observée entre les deux sexes pour l'ACTHémie est cependant moins prononcée ou absente pour la corticostérone surrénalienne et plasmatique. La différence avec les auteurs précédents peut être liée en partie au choix du moment du prélèvement des organes et du plasma après la fin de l'inhalation d'éther.

Les résultats observés après traitement par l'œstradiol et/ou le clomifène montrent qu'une réponse de type mâle au stress à l'éther peut être induite chez la femelle par une injection unique d'œstradiol, à condition qu'elle soit effectuée immédiatement après la naissance. Cet effet de l'œstradiol est aboli par un traitement simultané au clomifène. L'œstradiol pourrait donc "masculiniser" ou "déféminiser" les structures neuroendocriniennes impliquées dans le déterminisme du type de réponse au stress à l'éther. La testostérone, injectée selon la même procédure à des nouveau-nés femelles leur confère aussi, à l'âge de 8 jours, une réponse de type mâle (HARY et coll. 1986).

L'ensemble de ces résultats suggère que la testostérone, sécrétée en abondance chez le mâle au cours de la période périnatale, captée et convertie en œstradiol par l'hypothalamus (RHODA et coll. 1984), est responsable d'une différenciation fonctionnelle, sinon morphologique, des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse au stress à l'éther. Dans la mesure où l'orchidectomie à la naissance ne modifie pas la réponse de type mâle au stress réalisé à 8 jours (HARY et coll. 1986), on peut émettre l'hypothèse que la différenciation fonctionnelle s'établit chez le mâle au cours de la vie prénatale. Toutefois, chez la femelle, les structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse au stress sont encore sensibles aux androgènes administrés après la naissance, à condition que l'injection soit faite immédiatement après et non pas au-delà de quelques heures *postpartum*.

Dans la mesure où l'administration d'œstradiol aux nouveau-nés femelles a un effet comparable à celle de la testostérone sur le type de réponse au stress, on peut supposer que cette action de la testostérone implique sa conversion en œstradiol. Cette action est d'autre part limitée à une période "critique" du développement périnatal dont il conviendrait de déterminer la durée. Le fait d'une part que l'activité aromatasase de l'hypothalamus soit maximale chez le fœtus à 19 jours de gestation et décline ensuite assez vite, en particulier au cours de la première semaine de la vie extra-utérine (GEORGE et OJEDA, 1982), et d'autre part que l'injection d'œstradiol n'a pas d'effet masculinisant sur le mode de réponse corticotrope au stress à l'éther si elle n'est pas effectuée rapidement après la naissance, suggère que cette période "critique" est brève.

Le (ou les) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les stéroïdes sexuels peuvent influencer la fonction corticotrope hypophysaire demeure(nt) à déterminer. Si plusieurs équipes se sont attachées à apprécier l'action de la testostérone et de l'œstradiol sur l'expression du gène codant pour le précurseur de l'ACTH dans l'hypothalamus (la pro-opiomélanocortine : POMC) (WILCOX et ROBERTS, 1985 ; BLUM et coll. 1989 ; CHOWEN-BREED et coll. 1989), il n'y a pas été réalisé d'étude à notre connaissance sur l'expression de ce gène dans l'hypophyse. Au niveau de l'hypothalamus de rat, les résultats de ces études varient où divergent même selon le site étudié et le stéroïde administré : la testostérone administrée par voie générale réduit chez l'animal adulte la teneur en ARNm de la POMC au niveau de l'hypothalamus médiobasal (BLUM et coll. 1989) mais l'augmente au niveau du noyau arqué (CHOWEN-BREED et coll. 1989) où elle est diminuée par contre sous l'effet d'un traitement par l'œstradiol (WILCOX et ROBERTS, 1985).

L'activation de la fonction corticotrope au cours du stress à l'éther doit mettre en jeu le CRF et peut être aussi d'autres neurohormones hypothalamiques telles que l'AVP ou l'ocytocine. Ces dernières exercent un effet potentialisateur sur la sécrétion d'ACTH induite par le CRF (BENY et BAERTSCHI, 1982 ; GILLIES et coll. 1982 ; TURKELSON et coll. 1982 ; GIBBS, 1984 et 1986 ; REDEKOPP et coll. 1986). L'AVP et l'ocytocine sont présentes dans le sang porte-hypophysaire, à des concentrations plus élevées que dans le sang veineux périphérique, en raison de l'association de certaines fibres nerveuses du noyau paraventriculaire aux capillaires du plexus primaire du système porte (BURLET et coll. 1979). Les concentrations d'AVP et d'ocytocine dans le sang porte sont plus élevées que celles du CRF (GIBBS et VALE, 1982) et suffisantes pour potentialiser l'action du CRF *in vitro* (GIBBS, 1985). Plusieurs agents stressants, dont l'éther, augmentent les taux d'AVP et d'ocytocine dans le sang veineux périphérique et leurs sécrétions peuvent être dissociées de celle du CRF (GIBBS, 1985).

L'intérêt de l'étude des sécrétions d'AVP et d'ocytocine dans ce chapitre repose sur le fait qu'elles sont modulées par les hormones sexuelles et qu'elles évoluent différemment selon le sexe après un stress .

En effet :

- chez des rats adultes gonadectomisés, la testostérone inhibe la libération d'AVP alors que les œstrogènes l'augmentent (SKOWSKY et coll. 1979),
- les androgènes inhibent la sécrétion d'ocytocine chez le rat (WILLIAMS et coll. 1985) tandis que les œstrogènes la stimulent chez la femme (AMICO et coll. 1981),
- chez le rat adulte, l'augmentation des taux d'ocytocine dans le sang périphérique sous l'effet du stress par immobilisation est plus nette chez la femelle que chez le mâle (WILLIAMS et coll. 1985).

Nos résultats concernant les taux d'AVP et d'ocytocine dans l'hypothalamus, le lobe neuro-intermédiaire et le plasma périphérique ne mettent pas en évidence de différence notable selon les sexes. Nous ne confirmons donc pas les observations de WILLIAMS et coll. (1985), sur lesquelles nous reviendrons dans la discussion générale. Ces auteurs ont montré en effet, chez l'animal adulte, une élévation de l'ocytocine plasmatique plus nette chez la femelle que chez le mâle. Néanmoins, on ne peut pas conclure définitivement pour ce qui nous concerne en l'absence de différence réelle selon le sexe puisque les hormones n'ont pas été dosées dans le sang porte-hypophysaire qui draine un certain nombre de neurohormones de l'éminence médiane au lobe antérieur de l'hypophyse.

HARY (1990) a étudié les effets *in vivo* et *in vitro* des hormones (CRF, AVP, et ocytocine) et des amines (noradrénaline et sérotonine) capables de moduler la fonction corticotrope chez les nouveau-nés de 8 jours des deux sexes. Les effets de ces substances sur la sécrétion d'ACTH font l'objet d'une abondante littérature chez l'adulte (revues in FULLER, 1981 ; GIBBS, 1984 et 1986 ; ANTONI, 1986 ; LABRIE et coll. 1987 ; PLOTSKY, 1987 ; AL-DAMLUJI et coll. 1988 ; JONES et GILLHAM, 1988) mais très peu d'études ont été consacrées au nouveau-né :

- chez le nouveau-né, l'effet potentialisateur *in vivo* de la noradrénaline sur la réponse corticotrope à une inhalation d'éther est observé dans les deux sexes à une dose qui n'a pas d'effet propre sur la sécrétion d'ACTH, ce qui suggère un rôle potentiellement stimulant de cette substance dans ce type de stress. Cet effet potentialisateur de la noradrénaline est aboli par la phénoxybenzamine mais non par le propranolol, ce qui plaide en faveur d'une médiation α -adrénergique. *In*

in vitro, la noradrénaline n'a pas d'effet direct sur la sécrétion d'ACTH par le lobe antérieur et le lobe neuro-intermédiaire de l'hypophyse, à des concentrations respectivement de 15 à 3000 nmol/l et de 60 à 600 nmol/l. La noradrénaline diminue, faiblement, la sécrétion d'ACTH induite par le CRF à partir du lobe antérieur chez la femelle mais non chez le mâle.

- la sérotonine potentialise *in vivo* dans les deux sexes la sécrétion d'ACTH induite par le stress à l'éther. Toutefois, la cyproheptadine a un effet dissocié selon le sexe, inhibiteur chez le mâle et potentialisateur (faible) chez la femelle. Ces résultats vont aussi, avec ce qui a été dit pour la noradrénaline, dans le sens d'une activité corticotrope induite par le stress plus forte chez la femelle que chez le mâle. *In vitro*, la sérotonine n'a pas d'effet aux concentrations physiologiques sur la sécrétion d'ACTH.

- l'effet stimulant du CRF et de l'AVP sur la sécrétion *in vitro* d'ACTH par le lobe antérieur de l'hypophyse est comparable dans les deux sexes ; pour obtenir avec l'ocytocine une sécrétion d'ACTH comparable à celle observée avec l'AVP, il faut une dose molaire 200 fois supérieure. L'effet de synergie qu'exercent normalement chez l'adulte l'AVP et l'ocytocine sur la sécrétion d'ACTH est, à des concentrations physiologiques *in vitro*, observé également à 8 jours *postpartum* dans les deux sexes pour l'AVP, tandis qu'il n'est observé que chez la femelle pour l'ocytocine.

**4. Sécrétion périnatale de
testostérone et influence
d'un anti-GnRH et
de la dexaméthasone
sur l'axe gonadotrope**

4.1 INTRODUCTION

Nous venons de voir que l'administration de testostérone ou d'œstradiol à un nouveau-né femelle provoque la masculinisation des structures du cerveau impliquées dans la réponse au stress à l'éther réalisé à l'âge de 30 jours. Par contre, la "crise testiculaire" du nouveau-né mâle ne paraît pas avoir d'effet déterminant sur le type de réponse puisque, d'après HARY et coll. (1986), la castration du mâle à la naissance, avant même que ne se produise l'élévation postnatale de la testostéronémie, n'affecte pas le caractère mâle de la réponse au stress à l'âge de 8 jours. Il est donc vraisemblable que l'organisation fonctionnelle des structures cérébrales concernées s'établisse précocement au cours de la vie fœtale. Il existe en effet chez le fœtus mâle un pic de testostérone plasmatique à 18 ou 19 jours de gestation et la testostéronémie demeure ensuite plus élevée que chez la femelle jusqu'à la naissance (WEISZ et WARD, 1980). Cette élévation passagère de la testostéronémie pourrait être responsable, sinon d'une masculinisation précoce du système nerveux central, tout au moins de sa sensibilisation à la testostérone sécrétée en abondance dans la période périnatale. En faveur de cette hypothèse on peut citer le fait que l'acétate de cyprotérone injecté entre le 17ème et le 18ème jour de gestation "démasculinise" le comportement sexuel du mâle adulte (PERAKIS et STYLIANOPOULOU, 1986), lequel dépend de la crise testiculaire survenant à la naissance (CORBIER et coll. 1981). Par ailleurs un stress prénatal, qui abolit le pic de testostéronémie (WARD et WEISZ, 1980), "démasculinise" également le comportement sexuel de l'animal adulte (WARD, 1972 ; STYLIANOPOULOU, 1983). L'existence de récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes dans le cerveau fœtal, principalement dans l'aire pré-optique de l'hypothalamus (VITO et FOX, 1982), et d'une activité aromatasé hypothalamique (GEORGE et OJEDA, 1982 ; WEISZ et coll. 1982), dont le maximum coïncide avec celui de la testostéronémie (WEISZ et coll. 1982), conforte l'hypothèse des effets centraux de la testostérone *via* sa conversion en œstradiol au cours de la vie fœtale. La testostérone paraît être le principal régulateur de l'activité aromatasé, aussi bien chez l'adulte (ROSELLI et RESKO, 1984) que chez le fœtus (PERAKIS et STYLIANOPOULOU, 1986).

Si ces données permettent d'attribuer un rôle important à la sécrétion de testostérone du fœtus mâle dans le processus de masculinisation des structures cérébrales impliquées dans le comportement sexuel de l'adulte, son rôle dans le déterminisme du type de réponse au stress à l'éther est encore assez peu documenté. Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle la testostérone jouerait déjà un rôle au cours de la vie fœtale doit être vérifiée. Pour cela il est nécessaire de supprimer la sécrétion de testostérone -ou d'abolir ses effets- chez le fœtus mâle. Il convient au préalable de connaître le déterminisme de cette sécrétion. La testostérone circulante est, pour une large part, d'origine testiculaire. En effet, bien que le placenta produise de la testostérone, avec un maximum à 18 jours (MATT et MAC DONALD, 1984), la testostéronémie est bien plus élevée chez le mâle que chez la femelle (TURKELSON et coll. 1977). En outre, la concentration du testicule en testostérone atteint un maximum à 18-19 jours (WEISZ et WARD, 1980 ; HABERT et PICON, 1982 ; WARREN et coll. 1984) et, *in vitro*, la production de testostérone par le testicule augmente de 14 à 18-19 jours, puis décroît (NOUMURA et coll. 1966 ; WARREN et coll. 1973 et 1975 ; PICON, 1976 ; HABERT et PICON, 1984). L'évolution de l'activité du testicule fœtal est parallèle à celle de la testostéronémie. L'activation testiculaire paraît être liée à celle de la fonction gonadotrope hypophysaire, comme le suggèrent les faits suivants : la teneur hypophysaire en LH augmente brutalement et fortement entre les jours 15 et 18 de la gestation -avant l'apparition du pic prénatal de testostérone plasmatique- et puis plus faiblement jusqu'au terme de la gestation (HABERT et PICON, 1981 et 1982) ; des récepteurs de la LH ont été mis en évidence dans le testicule fœtal dès 15,5 jours de gestation, stade où on observe une augmentation de la production testiculaire d'AMPc et de testostérone en réponse à une stimulation par la LH (WARREN et coll. 1984). La population des récepteurs testiculaires à la LH augmente fortement à 18,5 jours de gestation et atteint un maximum à terme (WARREN et coll. 1984). L'acquisition de la sensibilité testiculaire à la LH est synchrone d'une libération de LH par l'hypophyse fœtale (SANYAL et VILLEE, 1971 ; WARREN et coll. 1975 ; FELDMAN et BLOCH, 1978 ; PICON et GANGNERAU, 1979), mais l'activité sécrétoire du testicule n'est réellement tributaire de l'hypophyse qu'en fin de gestation. En effet la suppression du complexe hypothalamo-hypophysaire par décapitation

du fœtus *in utero* ne réduit nettement les taux de LH plasmatique et de testostérone testiculaire qu'à partir de 20 jours (HABERT et PICON, 1982). Il semble toutefois exister une activité gonadotrope extra-hypophysaire, dont la nature et l'origine restent à préciser (HABERT et PICON, 1981).

Avant de tester l'hypothèse selon laquelle la sécrétion fœtale de testostérone est impliquée dans le déterminisme du type de réponse corticotrope au stress à l'éther, nous avons utilisé deux "outils" pharmacologiques susceptibles, sinon d'abolir, tout au moins de réduire cette sécrétion de testostérone chez le mâle. Il s'agit d'un anti-GnRH et de la dexaméthasone.

Nous avons rappelé les faits suggérant l'activation de l'axe hypophyso-testiculaire à partir du 18ème jour de la vie fœtale. La période où s'installe le contrôle central de la fonction gonadotrope hypophysaire est en revanche inconnue. L'existence d'une relation temporelle entre la sécrétion de testostérone et celle de LH n'est pas suffisante en soi pour en déduire que l'activité gonadotrope de l'hypophyse est sous contrôle hypothalamique dès le stade fœtal. L'hypophyse peut en effet fonctionner de façon autonome avant de passer sous contrôle hypothalamique. Une situation de ce type a été signalée pour la fonction corticotrope hypophysaire (DUPOUY et JOST, 1970). On peut penser que ce contrôle central est, par contre, en place à la naissance car la "crise testiculaire" postnatale est accompagnée d'une augmentation de la teneur du plasma en LH (ROFFI et coll. 1977 ; CORBIER et coll. 1978) et de l'hypothalamus en GnRH (CORBIER et coll. 1981).

Afin de voir si le contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope hypophysaire est déjà fonctionnel chez le fœtus, nous lui avons administré un anti-GnRH à différents stades de la vie fœtale puis nous avons recherché l'effet de ce traitement sur les taux plasmatiques de testostérone et de LH et les taux hypophysaires de LH et hypothalamiques de GnRH.

Nous avons vu que le stress psychique de la rate gravide réduit les taux plasmatiques de testostérone chez le fœtus (WARD et WEISZ, 1980 et 1984). Dans la mesure où les glucocorticoïdes bloquent la sécrétion de LH à l'état basal et après une stimulation par la GnRH chez différents animaux adultes -dont le rat- (BALDWIN et SAWYER, 1974 ; BALDWIN , 1979 ; RINGSTROM et SCHWARTZ, 1985 ; SUTER et SCHWARTZ, 1985a et 1985b ; TILBOT et CHILDS, 1985), l'effet inhibiteur du stress sur la fonction testiculaire fœtale pourrait être la conséquence -tout au moins en partie- d'un effet des glucocorticoïdes sur la sécrétion hypophysaire de LH.

La dexaméthasone réduit *in vivo* de façon dose-dépendante la sécrétion hypophysaire de LH aussi bien à l'état basal qu'après stimulation par la GnRH (BALDWIN et SAWYER, 1974). Chez la rate, la dexaméthasone prévient la décharge ovulatoire de LH et de FSH au cours du cycle œstrien (BALDWIN, 1979) ; chez le mâle, le cortisol supprime l'accroissement de la sécrétion de LH consécutive à la castration mais non celle de FSH (EUKER et coll. 1975) et la dexaméthasone bloque la sécrétion de LH induite par la manipulation (*handling stress*) (EUKER et coll. 1975). L'abaissement de la concentration de la LH circulante ne s'accompagne pas d'une réduction de son stock hypophysaire (SUTER et coll. 1988). Chez l'homme, les glucocorticoïdes réduisent en administration aiguë la testostéronémie (DOERR et PIRKE, 1976 ; SCHAISON et coll. 1978 ; MAC ADAMS 1986) soit par suppression directe de la sécrétion testiculaire (DOERR et PIRKE, 1976 ; EVAÏN et coll. 1976 ; SCHAISON et coll. 1978), soit par modification de la sécrétion de LH (MAC ADAMS et coll. 1986).

Nous avons pour notre part étudié les effets de la dexaméthasone sur la fonction gonadotrope périnatale en aigu et en chronique et, pour déterminer le site d'impact possible des glucocorticoïdes, nous avons mesuré les mêmes paramètres que ceux cités pour l'étude avec l'anti-GnRH.

4.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

4.2.1 Etude des hormones de l'axe gonadotrope dans la période périnatale chez l'animal intact

La testostéronémie a été dosée à différentes périodes, en fin de gestation (chaque jour du 17ème au 21ème et dernier jour) et après la naissance à terme par césarienne (de 10 à 120 minutes et 24 et 48 heures *postpartum*). Le contenu hypothalamique en GnRH, le contenu hypophysaire en LH et la teneur du plasma en LH ont été déterminés aux 19ème et 21ème jours de la gestation.

4.2.2 Traitement des fœtus par un antagoniste de la GnRH et surrénalectomie des rates gravides

4.2.2.1 Etude à différents stades de la gestation

Dans une première expérience des rates gravides ont été laparotomisées sous anesthésie à l'éther, au 17ème, 18ème, 19ème, ou 20ème jour de gestation. Tous les fœtus de certaines portées ont été injectés par voie sous-cutanée, à travers la corne utérine, d'un antagoniste de la GnRH [Acétyl-(D-Nal¹, D-Cpa², D-Trp, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰)GnRH], aimablement fourni par D.H. COY (Nouvelle-Orléans, U.S.A), à la dose de 5 µg par fœtus dans 50 µl d'un mélange de propylène glycol/NaCl à 0,9 % (40/60, v/v). Tous les fœtus d'autres portées témoins ont été injectés d'un même volume (50 µl) de solvant. Il a été préalablement montré que l'anti-GnRH, à la dose de 100 µg/adulte/jour, ramène la testostéronémie au niveau de celle du mâle castré (D.H. COY, communication personnelle). La dose que nous avons administrée aux fœtus a été calculée sur cette base, en prenant en compte le poids moyen d'un fœtus à terme. Les fœtus ont été sacrifiés 24 heures après l'injection de l'anti-GnRH ou du solvant. Le sang a été prélevé pour le dosage de la testostérone.

4.2.2.2 Etude à 19 jours de gestation chez des rates surrénalectomisées

Dans une deuxième expérience, des femelles gestantes ont été surrénalectomisées (par double lombotomie sous anesthésie à l'éther) au

14ème jour de la gestation afin de supprimer la source maternelle de glucocorticoïdes. Au 18ème jour, ces femelles ont subi une laparotomie et tous les fœtus ont été injectés par voie sous-cutanée, soit de l'antagoniste de la GnRH (5 µg), soit du même volume (50 µl) de solvant. Les fœtus ont été sacrifiés 24 heures plus tard, au 19ème jour de gestation, et nous avons déterminé les taux plasmatiques de testostérone et de LH ainsi que le contenu hypophysaire en LH.

4.2.3 Traitement des rates gravides et des rats nouveau-nés par la dexaméthasone

4.2.3.1 Traitement chronique des rates gravides

On a administré à des femelles gravides de l'acétate de dexaméthasone (Dectancyl^R, Roussel) dans l'eau de boisson (10 µg/ml) du 15ème au 21ème jour de la gestation. Dans la mesure où la consommation d'eau de ces femelles n'a pas excédé 20 ml/jour, on peut estimer qu'elles n'ont pas ingéré quotidiennement plus de 200 µg de dexaméthasone. Ces femelles, ainsi que des femelles témoins de même stade gravidique, ont été sacrifiées aux 18ème, 19ème, 20ème, ou 21ème jour de gestation.

Des fœtus de chacun de ces deux groupes expérimentaux, arrivés à terme, ont été délivrés par césarienne puis placés à 25° C dans une atmosphère humide pendant 10, 30, 40, 60, 90, ou 120 minutes (groupe contrôle), ou 30, 60, et 90 minutes (groupe traité par la dexaméthasone). Après le sacrifice, le sang a été prélevé pour le dosage de la testostérone plasmatique.

4.2.3.2 traitement en aigu des rates gravides ou des nouveau-nés

Dans une première expérience, on a administré à des femelles gravides, au 18ème jour de gestation, de la dexaméthasone par voie orale (10 µg/ml d'eau de boisson) et par voie sous-cutanée (500 µg) à deux reprises (à 8 et à 18 heures). Des femelles témoins ont fait l'objet de deux injections d'un même volume (500 µl) de solvant (NaCl à 0,9 %). Les animaux des deux groupes ont été sacrifiés le lendemain matin, au 19ème jour de gestation. Sur les prélèvements sanguins et tissulaires, nous avons dosé la testostérone plasmatique, la LH plasmatique et

hypophysaire et la GnRH hypothalamique.

Dans une deuxième expérience, des fœtus de mères intactes ont été délivrés par césarienne à terme (au 21ème jour) et injectés immédiatement après par voie sous-cutanée soit de 10 µg de dexaméthasone, soit d'un même volume (50 µl) de NaCl à 0,9 %. Ils ont été sacrifiés 30, 60, ou 90 minutes plus tard pour le dosage de la testostérone plasmatique.

4.2.4 Préparations des plasmas et des hypothalamus pour les dosages de testostérone, de LH et de GnRH

Les échantillons sanguins des fœtus dont les mères ont été traitées par l'anti-GnRH ou par le solvant ont été rassemblés, en respectant le sexe et le groupe expérimental, de façon à disposer d'un volume suffisant pour les dosages. Ces échantillons ont été prélevés rapidement pour éviter un stress chez le fœtus ; le temps qui s'écoule entre le prélèvement du premier et du dernier fœtus d'une portée n'est pas suffisant pour entraîner une augmentation significative des taux plasmatiques d'ACTH ou de corticostérone (DUPOUY, communication personnelle).

Les fragments hypothalamiques ont été homogénéisés dans 1 ml d'HCl à 0,1 M, chauffés à 80° C pendant 15 minutes, puis centrifugés. Les surnageants ont été neutralisés par une solution de NaOH 1 N, tampon phosphate 0,1 M, de façon à obtenir un pH de 7,4.

4.2.5 Dosage radioimmunologique de la GnRH et de la LH

Les dosages ont été effectués dans le laboratoire du Pr M. AUBERT à Genève.

La GnRH a été dosée par radioimmunologie selon une procédure déjà rapportée (AUBERT et coll. 1985) avec le sérum anti-GnRH RR-5. Les dosages de GnRH ont été effectués en deux séries, pour lesquelles les valeurs de l'ED₅₀ et des standards internes sont presque identiques.

La LH a été dosée par méthode radioimmunologique à double anticorps, en utilisant le kit préparé par le Dr A.F. PARLOW et distribué par le "*National Hormone and Pituitary Program*" (Baltimore, U.S.A.). L'anticorps NIADDK-anti-rLH S9 a été utilisé et les concentrations plasmatiques sont exprimées en valeurs de référence NIADDK-RP-1. Les coefficients de variation inter- et intra-essai sont inférieurs à 15 et à 7 %, respectivement.

Testostéronémie

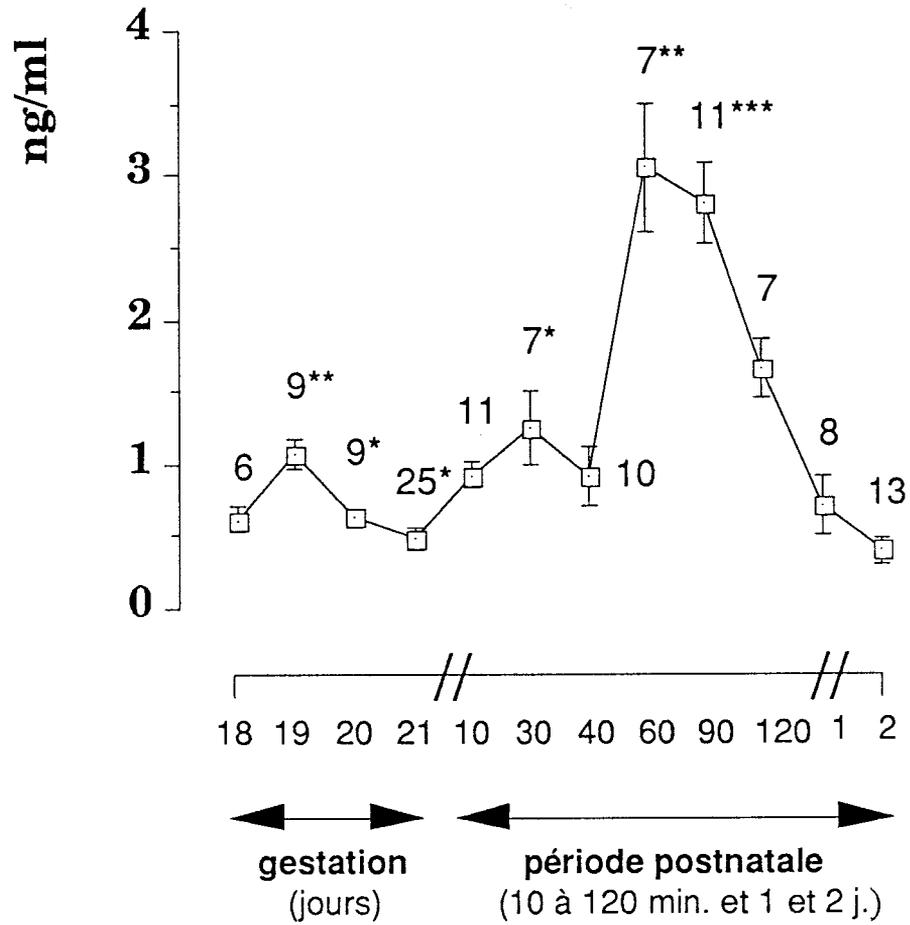


Fig. 6 : Testostéronémie du rat mâle au cours de la période prénatale (jours 18 à 21 de la gestation) et au cours de la période postnatale précoce (10 à 120 minutes, 1er et 2ème jours).

4.2.6 Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone (testostérone totale) a été réalisé avec le kit DIRIA-TESTOK (CEA-SORIN, Gif-sur-Yvette). Après 4 heures d'incubation à 37° C, la séparation hormone liée-hormone libre est effectuée par précipitation avec du polyéthylène-glycol et des anti-immunoglobines de lapin.

Le sérum anti-testostérone croise à 100 % avec la testostérone, 7,2 % avec la 5 α -dihydrotestostérone, 0,81 % avec l'androstènedione, 0,036 % avec la déhydro-épiandrostérone, 0,030 % avec le 5 α -androstène 3 α ,17 β -diol et 0,020 % avec d'autres stéroïdes tels que l'androstérone, la progestérone, l'œstrone, l'œstradiol, l'œstriol, le cortisol, la corticostérone et la désoxycorticostérone. Le coefficient de variation intra-essai est de 1,63 % (n = 12) et celui inter-essai est de 1,78% (n = 10).

4.3 RESULTATS

4.3.1 Les hormones de l'axe gonadotrope chez l'animal intact

L'ensemble des données expérimentales colligées à partir des études expérimentales a permis d'établir une courbe montrant l'évolution de la testostéronémie chez les mâles témoins au cours de la période périnatale (**figure 6**). La testostéronémie évolue de façon biphasique à partir du 18ème jour de la gestation. Un premier pic dépassant 1 ng/ml est observé au 19ème jour de gestation ; la testostéronémie décroît ensuite pour atteindre à terme (au 21ème jour) un nadir $\leq 0,5$ ng/ml. Très rapidement après la naissance par césarienne à terme la testostéronémie s'élève et atteint à 60 minutes un deuxième pic de l'ordre de 3 ng/ml, bien plus important que le premier pic prénatal. Deux jours après la naissance, les valeurs de la testostéronémie sont plus basses qu'au 18ème jour de la gestation. Chez les fœtus femelles ces valeurs de la testostéronémie (qui ne sont pas rapportées à la **figure 6**) sont bien plus faibles que celles des fœtus mâles de même portée pour chaque jour étudié ($\leq 0,2$ ng/ml).

La teneur du plasma en LH est significativement plus élevée chez les femelles que chez les mâles aux deux stades étudiés de la gestation, au 19ème et au 21ème jour (**Tableau II**) ; elle augmente dans les deux sexes de façon significative entre ces deux stades (**Tableau II**). Le contenu hypophysaire en LH à 19 et à 21 jours ne présente pas de différence sexuelle ; la valeur moyenne est plus basse à 21 jours dans les deux sexes qu'à 19 jours (**Tableau II**). Le contenu de l'hypothalamus en GnRH est plus élevé chez le mâle que chez la femelle, tant à 19 qu'à 21 jours ; on ne note pas de variation significative dans les deux sexes entre les deux stades étudiés (**Tableau II**).

Tableau II. GnRH hypothalamique, LH hypophysaire et plasmatique chez les fœtus mâles et femelles intacts au 19ème et au 21ème jour de gestation.

	19ème jour			21ème jour		
	mâles (M)	femelles (F)	M vs F	mâles (M)	femelles (F)	M vs F
GnRH hypothalamique, pg/fragment	13,6 ± 1,6 (22)	8,6 ± 1,3 (18)	p < 0,05	12,8 ± 1,0 (13)	(ns) 6,0 ± 0,8 (9)	(ns) p < 0,001
LH hypophysaire, ng/glande	22,6 ± 1,2 (7)	24,8 ± 1,7 (11)	n.s.	13,3 ± 3,0 (7)	(**) 12,5 ± 5,0 (5)	(**) n.s.
LH plasmatique, ng/ml	2,6 ± 0,8 (14)	7,5 ± 0,8 (10)	p < 0,001	15,3 ± 1,2 (12)	(***) 20,9 ± 1,2 (12)	(***) p < 0,01

Le nombre de déterminations est indiqué entre parenthèses.

Comparaison par sexe entre les stades : (ns) ($p > 0,05$), (**) ($p \leq 0,01$) et (***) ($p < 0,001$).

4.3.2 Influence de l'anti-GnRH sur les hormones de l'axe gonadotrope

4.3.2.1 Etude à différents stades de la gestation

La testostéronémie des fœtus mâles de 18 jours n'est pas significativement affectée par les injections d'anti-GnRH ou de solvant faites à 17 jours (**figure 7**). En revanche, aux jours 19, 20, et 21, la testostéronémie des animaux injectés d'anti-GnRH la veille est significativement plus basse que celle des animaux injectés de solvant (**figure 7**). Chez ces derniers elle est par ailleurs plus basse à 19 et à 20 jours que chez les animaux intacts mais non à 21 jours (**figure 7**). Chez les femelles, la testostéronémie, dont la valeur est < à 0,2 ng/ml chez les animaux intacts, n'est pas affectée par l'administration d'anti-GnRH ou de solvant (données non montrées).

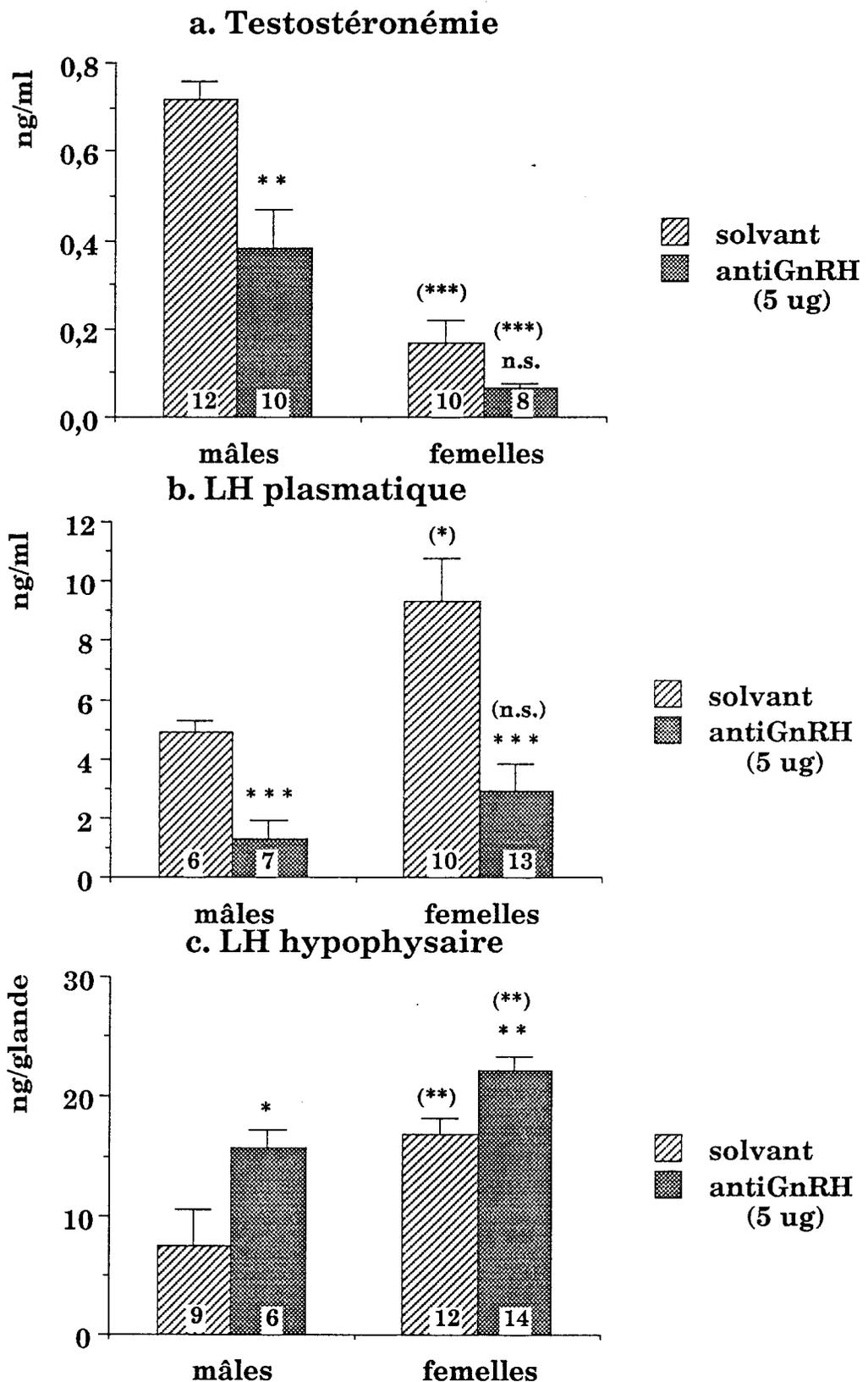


Fig. 8 : Testostéronémie (a), LH plasmatique (b) et hypophysaire (c) des fœtus mâles et femelles de 19 jours de mères surrénalectomisées au 14ème jour de gestation. Les fœtus ont été injectés au 18ème jour d'un anti-GnRH (5 µg) ou d'un même volume de solvant (500 µl).

Comparaison vs "solvant" chez les mâles et les femelles : n.s. ($p > 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) et *** ($p < 0,001$)

Comparaison vs les mâles dans les groupes "anti-GnRH" et "solvant" : (n.s.) ($p > 0,05$), (*) ($p < 0,05$), (**) ($p < 0,01$) et (***) ($p < 0,001$).

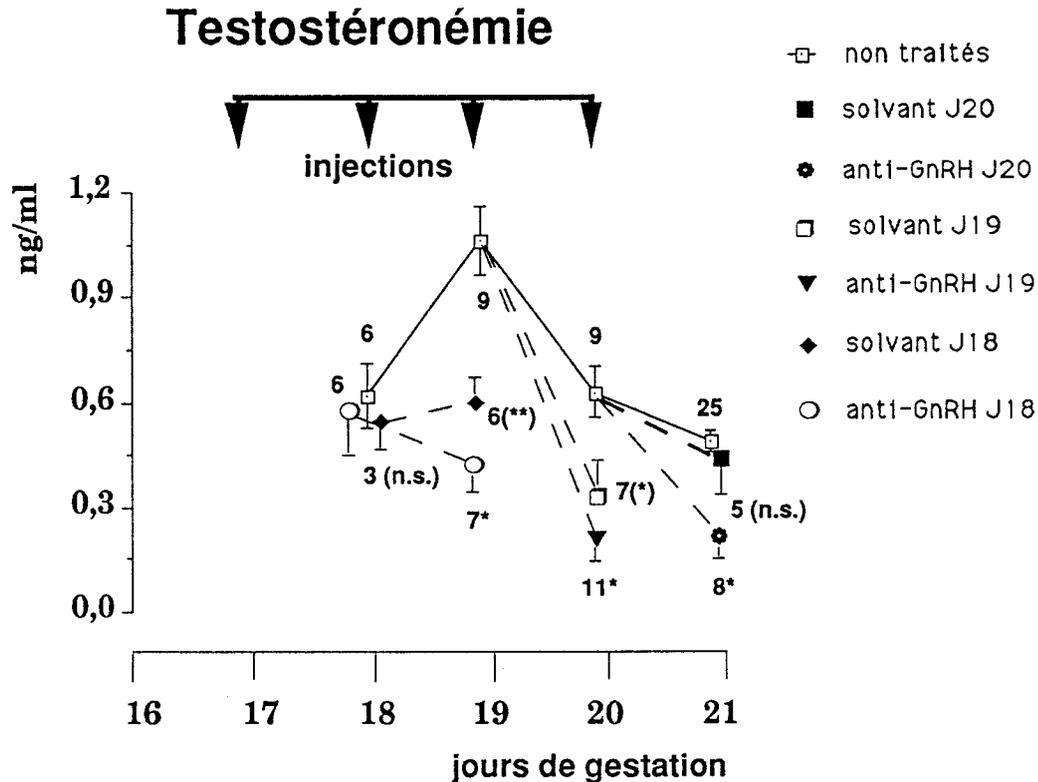


Fig. 7 : Testostéronémie des fœtus de rat mâles injectés à différents stades de la gestation (17, 18, 19, ou 20 jours) d'anti-GnRH (5 µg) ou d'un même volume (500 µl) de solvant (propylène glycol/NaCl). J18, J19 et J20 indiquent les jours où l'injection a été pratiquée.

Comparaison des fœtus injectés d'anti-GnRH *vs* les fœtus injectés de solvant : * ($p < 0,05$)

Comparaison des fœtus injectés de solvant *vs* les fœtus non traités : (n.s.) ($p > 0,05$), (*) ($p < 0,05$) et (**) ($p < 0,01$).

4.3.2.2 Etude à 19 jours de gestation chez des rates surrenalectomisées

La testostéronémie des fœtus mâles injectés au 18ème jour d'anti-GnRH est significativement plus faible que chez ceux injectés de solvant (**figure 8a**). Chez ces derniers, la testostéronémie est à un niveau comparable à celui observé à 19 jours chez les fœtus de mères non surrenalectomisées, injectées de solvant au 18ème jour (**figures 7 et 8a**).

Dans les deux sexes, les taux plasmatiques de LH sont significativement plus bas sous l'effet du traitement par l'anti-GnRH que chez les animaux injectés de solvant (**figure 8b**). En revanche, et toujours dans les deux sexes, le contenu hypophysaire en LH est plus élevé chez les animaux traités par l'anti-GnRH (**figure 8c**). Chez les femelles injectées de solvant, les taux de LH dans le plasma et dans l'hypophyse sont plus élevés que chez les mâles ; cette différence n'est pas retrouvée chez les animaux injectés d'anti-GnRH pour la LH plasmatique (**figure 8c**).

4.3.3 Influence de la dexaméthasone sur les hormones de l'axe gonadotrope

4.3.3.1 Traitement chronique des rates gravides

Le traitement chronique des rates gravides par la dexaméthasone abolit les pics plasmatiques de testostérone observés chez les fœtus mâles intacts au 19ème jour de la gestation et chez les nouveau-nés une heure après la naissance par césarienne (**figure 9**). Aux différents stades de l'étude, les valeurs de testostéronémie des fœtus ou des nouveau-nés de mères traitées par la dexaméthasone sont plus basses que chez les animaux de mères intactes, sauf au 18ème jour de gestation, où il n'y a pas de différence significative (**figure 9**).

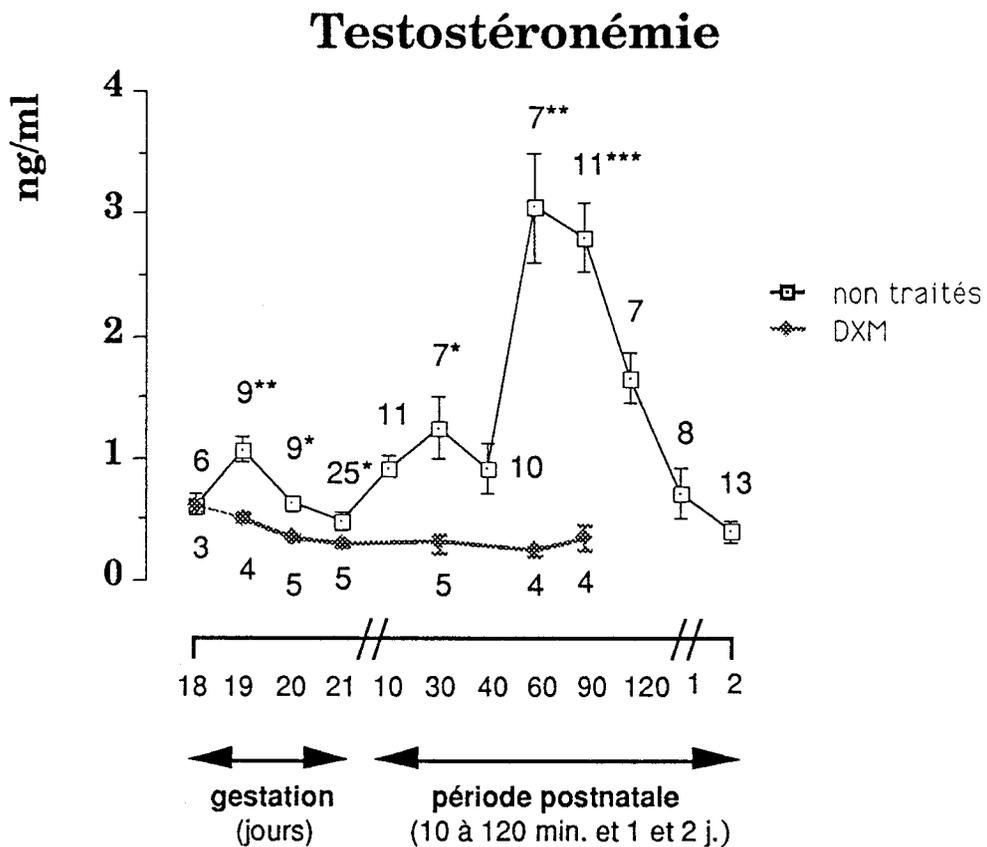


Fig. 9 : Testostéronémie des fœtus et nouveau-nés mâles de mères intactes ou traitées par la dexaméthasone (DXM, 10 µg/ml d'eau de boisson) du 15ème au 21ème jour de la gestation. Comparaison vs les animaux de mères intactes : * (p < 0,05), ** (p < 0,01) et *** (p < 0,001).

4.3.3.2 *Traitement en aigu des rates gravides ou des nouveau-nés*

Au 19ème jour de gestation, soit 24 heures après le traitement des rates gravides par la dexaméthasone, la testostéronémie des mâles et les taux plasmatiques de LH des fœtus des deux sexes sont plus bas que chez les fœtus de mères injectées de solvant (**figures 10a et 10b**). Les taux plasmatiques de LH des fœtus femelles de mères non traitées par la dexaméthasone sont plus élevés que ceux des fœtus mâles de même portée, mais cette différence entre les deux sexes n'est pas retrouvée chez les fœtus de mères traitées par la dexaméthasone (**figure 10b**). Les contenus hypophysaires en LH sont plus élevés dans les deux sexes chez les fœtus de mères traitées par la dexaméthasone (**figure 10c**). Le traitement par la dexaméthasone n'a pas d'effet significatif sur le contenu hypothalamique en GnRH dans les deux sexes (**figure 10d**). Ce contenu est plus élevé chez les mâles que chez les femelles (**figure 10d**).

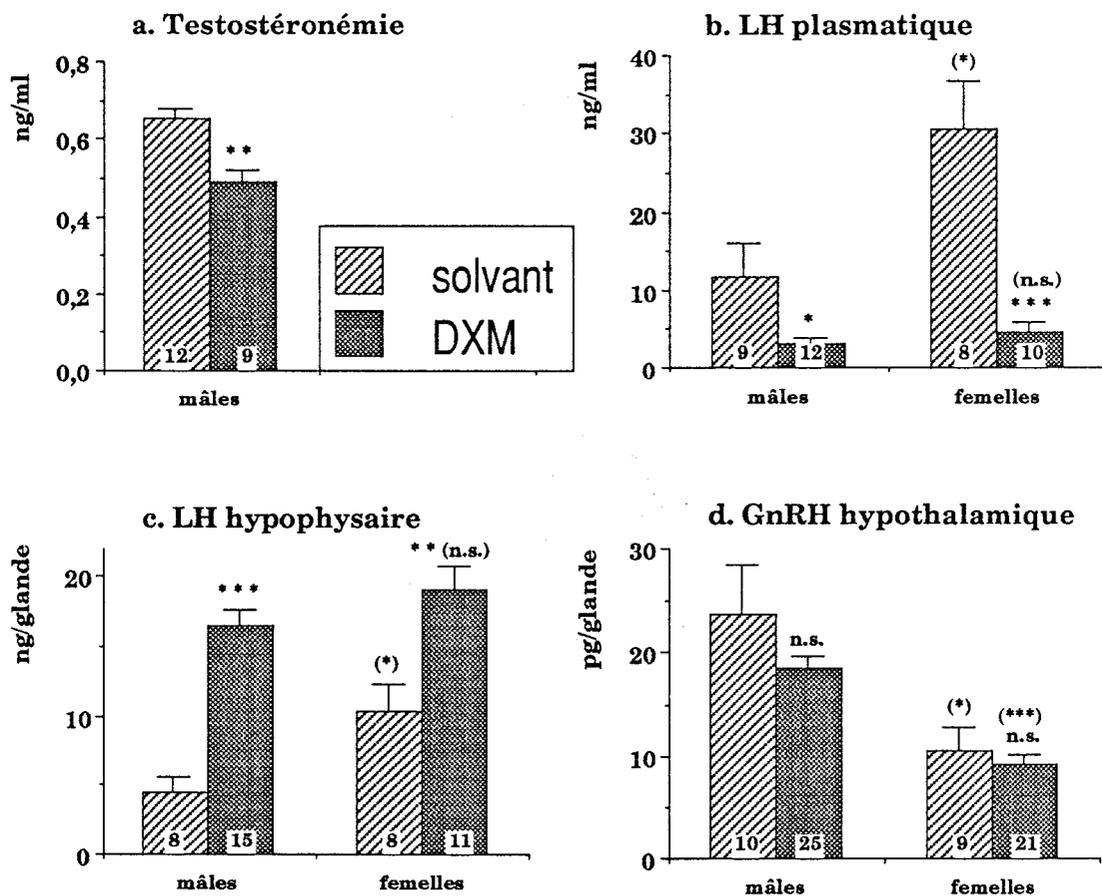


Fig. 10: Testostéronémie (a), LH plasmatique (b) et hypophysaire (c) et GnRH hypothalamique (d) chez les fœtus mâles et femelles de 19 jours dont les mères ont été traitées au 18ème jour de la gestation par la dexaméthasone (DXM) ou le solvant (NaCl 0,9 %).

Comparaison *vs* "solvant" chez les mâles et les femelles : n.s. ($p > 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) et *** ($p < 0,001$)

Comparaison *vs* les mâles du même groupe expérimental (solvant ou dexaméthasone) : (n.s.) ($p > 0,05$), (*) ($p < 0,05$) et (***) ($p < 0,001$).

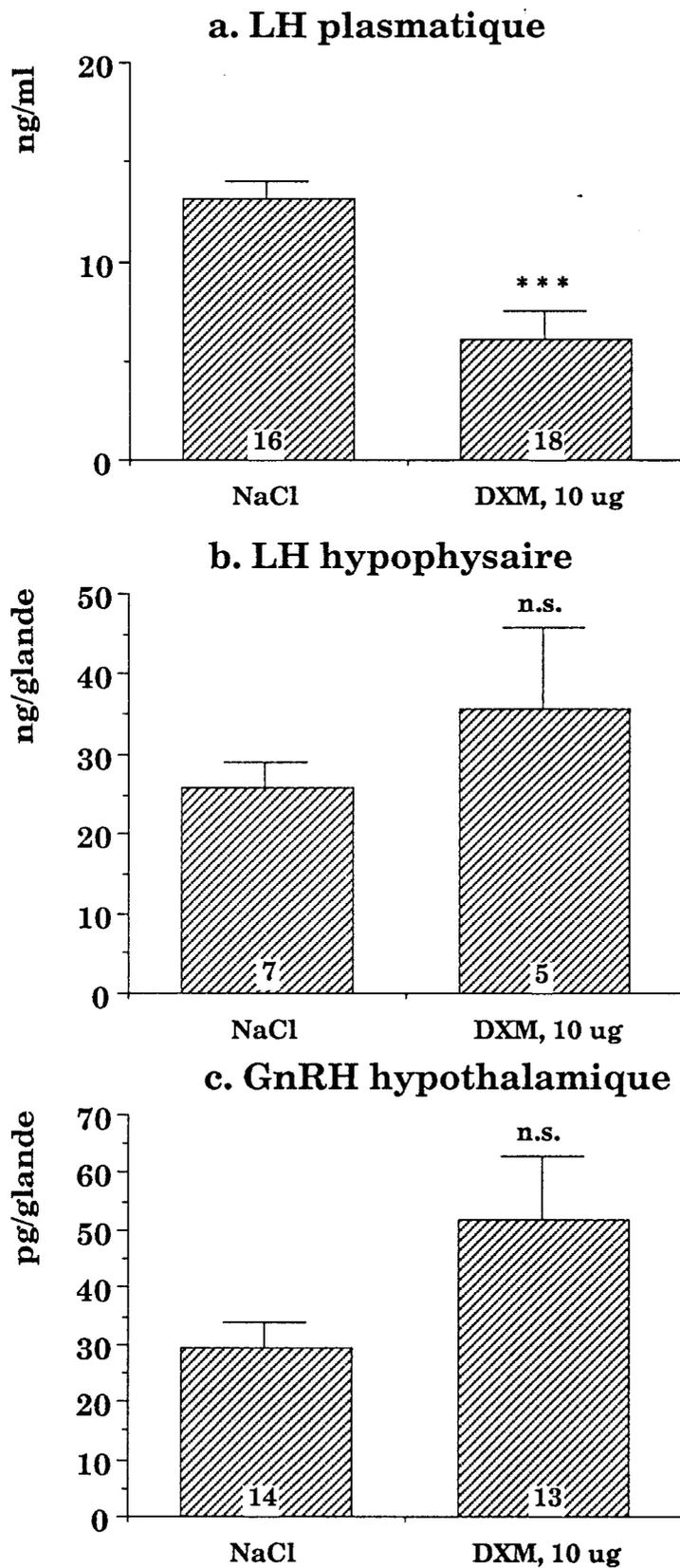


Fig. 12: LH plasmatique (a) et hypophysaire (b) et GnRH hypothalamique chez les mâles une heure après la naissance à terme par césarienne immédiatement suivie d'une injection de dexaméthasone (DXM, 10 µg s.c.) ou de solvant (NaCl 0,9 %). Comparaison vs "solvant" : n.s. ($p > 0,05$) et *** ($p < 0,001$).

Chez les nouveau-nés, l'augmentation progressive de la testostéronémie observée chez les mâles intacts dans les 90 minutes suivant la naissance est retrouvée chez ceux qui ont été injectés de solvant à la naissance, mais non chez ceux qui ont reçu de la dexaméthasone (**figure 11**). Ces traitements n'ont pas d'effet sur la testostéronémie du nouveau-né femelle (données non rapportées).

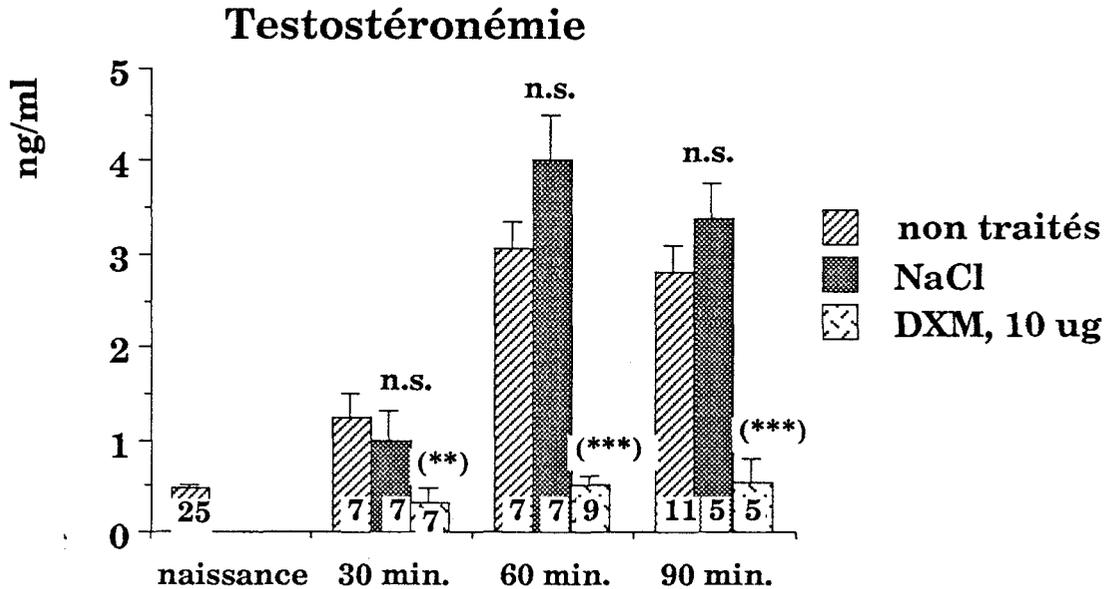


Fig. 11: Testostéronémie des nouveau-nés mâles intacts ou traités par la dexaméthasone (DXM, 10 µg s.c.) ou le solvant (NaCl 0,9 %) immédiatement après la naissance à terme par césarienne.

Comparaison *vs* les animaux intacts à 30, 60 ou 90 minutes : n.s. ($p > 0,05$)

Comparaison *vs* "NaCl" à 30, 60 ou 90 minutes : (**) ($p < 0,01$) et (***) ($p < 0,001$).

Une heure après la naissance, la teneur du plasma en LH chez les mâles injectés de dexaméthasone est significativement plus basse que chez ceux injectés de solvant (**figure 12a**). Une tendance inverse est observée pour la LH hypophysaire et la GnRH hypothalamique (**figures 12b et 12c** ; les teneurs en LH et en GnRH sont plus élevées, mais de façon non significative, chez les nouveau-nés injectés de dexaméthasone par rapport aux animaux de la même fratrie injectés de solvant (**figures 12b et 12c**).

4.4 DISCUSSION

4.4.1 Axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire chez les fœtus normaux

Avant de discuter les effets de l'anti-GnRH et de la dexaméthasone, nous voudrions revenir sur les résultats des dosages des hormones de l'axe gonadotrope chez l'animal intact dans la période périnatale. La testostéronémie du fœtus mâle est plus élevée que celle de la femelle. Ces résultats sont en accord avec ceux de TURKELSON et coll. (1977), de CORBIER et coll. (1978) et de SLOB et coll. (1980). En revanche, la teneur du plasma en LH est plus élevée chez la femelle que chez le mâle au 19ème et au 21ème jour de la gestation, alors que le contenu de l'hypophyse en LH est comparable dans les deux sexes. Le contenu de l'hypothalamus en GnRH est moindre chez la femelle que chez le mâle. Ces résultats suggèrent que le rétro-contrôle négatif de la testostérone sur la sécrétion de LH, et vraisemblablement de GnRH, est opérationnel au cours des derniers jours de la gestation.

4.4.2 Influence de l'anti-GnRH

La testostéronémie du fœtus mâle est plus basse le lendemain de l'injection d'anti-GnRH dès lors que celle-ci est faite après le 17ème jour de gestation. Ceci suggère que le contrôle central de la fonction gonadotrope hypophysaire s'établit entre 18 et 19 jours de gestation. Par ailleurs le traitement par l'anti-GnRH abolit le pic de testostérone plasmatique observé chez les fœtus normaux à 19 jours de gestation. Il est donc vraisemblable que l'activation du testicule à ce stade de la gestation est la conséquence de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et/ou d'une augmentation de la sensibilité du testicule à la LH circulante. Chez ces fœtus mâles traités par anti-GnRH, la testostéronémie n'atteint pas toutefois les valeurs très basses rencontrées chez les femelles de mères non surrénalectomisées. Cette différence pourrait être due à une dose insuffisante d'anti-GnRH ou à l'existence d'une activité gonadostimulante extra-hypophysaire indépendante d'un contrôle hypothalamique, comme cela a été suggéré par HABERT et PICON (1981). L'anti-GnRH injecté le 19ème jour de la gestation a néanmoins provoqué la réduction de la teneur du plasma en LH et l'augmentation du contenu hypophysaire en LH. Cet accroissement du stockage glandulaire est

vraisemblablement le reflet d'une réduction de la sécrétion hypophysaire de LH liée à la suppression de l'action de la GnRH. Nos données expérimentales plaident en faveur de l'existence d'une régulation hypothalamique périnatale de l'activité gonadotrope hypophysaire et confortent les observations antérieures de DAIKOKU et coll. (1980 et 1981), de SALISBURY et coll. (1982) et de MATWIJIW et FAIMAN (1987). Par ailleurs, nos résultats soulignent que l'activité testiculaire est tributaire de la LH en fin de la gestation. Ceci est en accord avec les hypothèses de HABERT et PICON (1981 et 1982). Chez d'autres espèces que le rat, la sécrétion de la LH hypophysaire apparaît dépendante de celle de la GnRH avant la fin de la vie fœtale. Ainsi, chez le fœtus ovin, dès le 104^{ème} jour de la gestation, l'hypothalamus contrôle la fonction gonadostimulante de l'hypophyse (MATWIJIW et FAIMAN, 1987). Ces auteurs ont abouti à cette conclusion à la suite d'expériences au cours desquelles ils ont administré en *bolus* un antagoniste de la GnRH.

L'administration de solvant au fœtus provoque aussi une réduction de la testostéronémie à 19 et à 20 jours, moins prononcée toutefois que celle induite par l'anti-GnRH. L'abaissement de la testostéronémie qui accompagne l'injection de solvant pourrait être liée aux glucocorticoïdes libérés dans la circulation à la suite de l'anesthésie et de la laparotomie de la mère puis de la manipulation de la corne utérine lors du traitement des fœtus. Le fait qu'après l'injection de solvant la testostéronémie soit aussi basse chez les fœtus de mère surrénalectomisée que chez ceux de mère non surrénalectomisée suggère que les glucocorticoïdes maternels ne doivent pas être responsables de cet effet sur la sécrétion de testostérone. En revanche, un effet des glucocorticoïdes d'origine fœtale ne peut pas être exclu.

L'anti-GnRH pourrait exercer un effet direct sur le testicule, qui contient des récepteurs à la GnRH (RAESIDE et coll. 1984). Si la détryptoréline, qui est un analogue de la GnRH, ne réduit pas la réponse testiculaire à la gonadotropine chorionique humaine (hCG) (HUHTANIEMI et CATT, 1985), la buséréline (autre analogue de la GnRH) stimule en aigu *in vivo et in vitro* la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (SHARPE et COOPER, 1987). Par contre, en traitement chronique, la buséréline, comme des doses supra-

physiologiques de LH et d'hCG, exerce *in vitro* un effet inhibiteur sur cette sécrétion (SHARPE et COOPER, 1987). Pour tenter d'expliquer la divergence des résultats obtenus avec la buséreline, SHARPE et COOPER (1987) ont étudié l'influence de certaines hormones dans la régulation de la fonction paracrine des cellules de Leydig. Ces auteurs ont observé que les opiacés et l'ocytocine ne pouvaient être impliqués ; l'AVP pourrait jouer un rôle, mais probablement mineur. L'explication de la divergence des résultats passe plus vraisemblablement par un phénomène de désensibilisation de la réponse testiculaire à la GnRH, caractérisé par une altération de l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse (SHARPE et COOPER, 1982).

4.4.3 Influence de la dexaméthasone

En traitement chronique la dexaméthasone réduit, au terme de la gestation, la testostéronémie des fœtus mâles et abolit les deux pics de sécrétion normalement observés dans les périodes pré- et postnatales. En traitement aigu, la dexaméthasone prévient aussi l'apparition du pic de testostérone qui survient peu de temps après la naissance. Toutefois, dans la mesure où la testostéronémie n'a pas été déterminée dans notre expérience au-delà de 90 minutes après la naissance, nous ne pouvons pas savoir si l'augmentation de la testostéronémie est définitivement prévenue ou si elle est seulement différée. La dexaméthasone réduit aussi la teneur du plasma en LH chez le fœtus de 19 jours, de façon comparable dans les deux sexes, tandis qu'elle augmente le contenu hypophysaire en LH ; en revanche, le contenu hypothalamique en GnRH n'est pas significativement affecté.

L'effet inhibiteur de la dexaméthasone observé sur la testostéronémie du fœtus et du nouveau-né est probablement de nature pharmacologique compte-tenu des doses utilisées. L'augmentation spontanée, mais éphémère, de la sécrétion de corticostérone chez le fœtus à 19 jours de gestation et chez le nouveau-né à la naissance (DUPOUY et CHATELAIN, 1987) n'a pas d'influence notable sur l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. En effet, les pics de la testostérone coexistent avec ceux de la corticostérone. Il faut cependant souligner que l'augmentation physiologique de la corticostéronémie au cours d'un stress peut avoir un impact sur la fonction gonadotrope. En effet, les fœtus

mâles de mères injectées de solvant à 18 jours présentent, à 19 jours, une testostéronémie inférieure à celle des fœtus de mères intactes. La différence entre ces deux groupes expérimentaux pourrait être liée à un effet des glucocorticoïdes libérés à la suite du stress occasionné par la manipulation de la corne utérine et l'injection des fœtus.

L'effet des glucocorticoïdes, exogènes ou endogènes, sur la fonction gonadotrope a déjà fait l'objet de quelques travaux. Chez le rat mâle, la dexaméthasone bloque la sécrétion de LH induite par la manipulation des animaux (*handling stress*) (EUKER et coll. 1975). WARD et WEISZ (1980 et 1984) ont montré qu'un stress chez la rate gravide (illumination répétée de cages de contention du 14 au 21ème jour de la gestation) prévient l'augmentation de la testostéronémie du fœtus mâle. Enfin, SAPOLSKY (1985) a montré que le stress par capture et immobilisation réduit la testostéronémie de façon importante chez le babouin, tout comme l'administration de dexaméthasone.

Le mécanisme par lequel les glucocorticoïdes affectent la fonction gonadotrope est imparfaitement connu. Certains arguments expérimentaux plaident en faveur d'une action hypophysaire. La dexaméthasone marquée au tritium est en effet capable de se lier spécifiquement aux cellules gonadotropes et corticotropes (REES et coll. 1977). Par ailleurs la dexaméthasone abolit à une étape postérieure à l'interaction neurohormone-récepteur la réponse gonadotrope à la GnRH (PADMANABHAN et coll. 1983 ; ROSEN et coll. 1988) et accentue, de façon dose-dépendante, le phénomène d' "*up-regulation* " qu'exerce la GnRH sur ses propres récepteurs (ROSEN et coll. 1988). D'autres arguments suggèrent une action des glucocorticoïdes au niveau de l'hypothalamus, par freinage de la sécrétion de GnRH (SUTER et SCHWARTZ, 1985a et 1985b ; ROSEN et coll. 1988). Les glucocorticoïdes peuvent enfin agir au niveau testiculaire, comme cela a été suggéré chez l'homme (DOERR et PIRKE, 1976 ; EVAIN et coll. 1976 ; SCHAISON et coll. 1978), en bloquant la sécrétion de testostérone induite par la LH (revues *in* SAPOLSKY, 1985 et RIVIER et VALE, 1985). Un tel mécanisme d'action est cependant l'objet de controverses. MEIDAN et coll. (1985) ont rapporté que la dexaméthasone n'affecte pas la biosynthèse de testostérone par des cellules de Leydig de rats nouveau-nés traitées par hCG. Nos résultats,

qui mettent en évidence des effets de la dexaméthasone sur les taux de LH dans le plasma et l'hypophyse, comparables dans les deux sexes, ne permettent pas d'invalider l'hypothèse d'une action des glucocorticoïdes au niveau du testicule. Celle-ci ne peut être toutefois ni prédominante ni exclusive. Nos résultats expérimentaux plaident davantage en faveur d'une action hypothalamique et/ou hypophysaire, d'ampleur comparable dans les deux sexes.

**5. Influence de la sécrétion fœtale
de testostérone sur la réponse
corticotrope au stress à l'éther
à l'âge de 30 jours**

5.1 INTRODUCTION

Dans cette dernière partie de notre travail, nous avons étudié le rôle de la sécrétion fœtale de testostérone dans le déterminisme du type de réponse corticotrope au stress à l'éther. Une telle étude implique d'abolir, ou tout au moins de réduire, les effets de la sécrétion fœtale de testostérone à défaut de pouvoir pratiquer une orchidectomie fœtale *in utero*. Un hypogonadisme peut être induit -comme il vient d'être présenté- soit par un anti-GnRH, soit par la dexaméthasone. Ces deux "outils" pharmacologiques présentent chacun un inconvénient majeur. Avec l'anti-GnRH, il a été difficile de répéter les expériences car on n'a pu disposer de ce produit rare qu'en très faible quantité. Par ailleurs, il a été nécessaire d'opérer à plusieurs reprises les femelles gravides et d'injecter tous les fœtus, ce qui fait courir un risque élevé de mortalité post-opératoire. La dexaméthasone, aux doses utilisées, induit une hypotrophie corporelle et surrénalienne, ce qui gêne par la suite l'interprétation de la réponse corticotrope au stress à l'éther.

Compte-tenu de ces difficultés, nous avons préféré utiliser une autre approche expérimentale en pratiquant un blocage pharmacologique de l'activité aromatasase. Nous avons vu précédemment qu'une réponse de type mâle au stress à l'éther pouvait être induite chez des animaux femelles par l'injection d'œstradiol ou de testostérone à la naissance (HARY et coll. 1986). Ces résultats suggèrent que l'action de la testostérone pourrait être médiée par son aromatisation en œstradiol. L'existence d'une activité aromatasase dans l'hypothalamus des fœtus et des nouveau-nés des deux sexes nous a incités dans une première expérience à traiter des rates gravides par un inhibiteur de l'aromatasase, l'ATD (1,4,6-androstatriène 3,17-dione), au cours de la période pendant laquelle survient chez le fœtus mâle l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (WEISZ et WARD, 1980).

Nous rappellerons qu'une activité aromatasase est présente dans la période périnatale au niveau de l'hypothalamus (RAYNAUD et coll. 1971 ; REDDY et coll. 1974), tout comme dans le système limbique (REDDY et coll. 1974). L'importance physiologique supposée du pic prénatal de testostérone est à mettre en relation avec l'évolution de l'activité

aromatase. Celle-ci présente un maximum au 19^{ème} jour de gestation, contemporain de celui de la testostéronémie (GEORGE et OJEDA, 1982). L'activité aromatase est plus faible à 21 jours qu'à 19 jours mais augmente à nouveau dans les cinq premiers jours de la vie extra-utérine, pour décliner ensuite rapidement, atteignant au terme de la première semaine de la vie postnatale un niveau comparable à celui de l'adulte (GEORGE et OJEDA, 1982).

Dans une deuxième expérience, nous avons traité *in utero* tous les fœtus d'une même portée par de l'œstradiol en espérant obtenir chez les fœtus mâles ainsi traités une "déféminisation" du mode de réponse corticotrope au stress à l'éther lorsque les animaux auront atteint l'âge de 30 jours. L'injection d'œstradiol a été réalisée au 19^{ème} jour de la gestation, c.à.d. au moment où survient le pic prénatal de testostérone dans le plasma (WEISZ et WARD, 1980).

5.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

5.2.1 Traitement des rates gravides par un inhibiteur de l'aromatase

Des rates gravides ont été injectées par voie sous-cutanée chaque jour, du 17^{ème} au 21^{ème} jour de la gestation, soit d'ATD (inhibiteur de l'aromatase : 1,4,6-androstatriène 3,17-dione, Steraloids, 5 mg par rate), soit d'un même volume (100 µl) de solvant (alcool benzylique/DMSO, v/v). Certaines rates gravides des deux séries expérimentales ("ATD" et "solvant") ont été sacrifiées par décapitation à terme (au jour 21 de la gestation), 3 heures environ après la dernière injection d'ATD ou de solvant. Leurs fœtus ont été prélevés par césarienne ; les mâles ont été maintenus à 25° C pendant 0 ou 90 minutes avant d'être sacrifiés par décapitation. Des échantillons sanguins ont été prélevés pour dosage de la testostérone.

Les autres rates gravides des deux groupes expérimentaux ("ATD" et "solvant"), qui ont mené leur gestation à terme, ont donné naissance à des jeunes, sevrés à l'âge de 21 jours *postpartum*. Ces jeunes animaux ont été soumis à une inhalation d'éther de 2 minutes à l'âge de 30 jours. Leur sacrifice a été réalisé soit juste avant le stress, soit 30

minutes après la fin de l'inhalation d'éther ; le sang a été prélevé pour le dosage de l'ACTH.

5.2.2 Traitement des fœtus par l'œstradiol

Après anesthésie à l'éther des rates gravides puis laparotomie, les fœtus ont été injectés *in utero* par voie sous-cutanée, au 19ème jour de la gestation, soit d'œstradiol (2 µg), soit d'un même volume de solvant (50 µl d'huile d'olive). Ces animaux, nés spontanément à terme, ont été exposés à une inhalation d'éther au 30ème jour de la vie postnatale. Après leur sacrifice, du sang a été prélevé pour les dosages de l'ACTH, de la testostérone et de l'œstradiol.

5.2.3 Dosage radioimmunologique de l'ACTH

Le dosage radioimmunologique de l'ACTH plasmatique a été réalisé sans extraction préalable à l'aide du kit Allegro HS-ACTH (Nichols Institute, CA 92675, U.S.A.). L'anticorps utilisé pour le dosage est de type monoclonal et il n'y a pas de réaction croisée avec l'ACTH₁₋₁₀, l'ACTH₁₁₋₂₄, l'α-MSH, la β-MSH, et la β-endorphine. Les coefficients de variation intra- et inter-essai sont, respectivement, de 3,2 % (n = 20) et de 6,8 % (n = 12). Les taux d'ACTH sont exprimés en pg/ml, l'ACTH₁₋₃₉ humaine étant utilisée comme standard de référence.

5.2.4 Dosage radioimmunologique de la testostérone et de l'œstradiol

Les dosages de la testostérone et de l'œstradiol ont été réalisés avec les kits DIRIA-TESTOK et DIRIA-ESTRK (CEA-SORIN, Gif-sur-Yvette). Après 4 heures d'incubation (à 37° C pour le dosage de la testostérone et à température ambiante pour celui de l'œstradiol) la séparation hormone liée-hormone libre est effectuée par précipitation avec du polyéthylène-glycol et des anti-immunoglobines de lapin.

Les caractéristiques du dosage de la testostérone ont été précédemment indiquées (*cf.* 4.2.6). Le sérum anti-testostérone croise à 0,05 % avec l'ATD.

Le sérum anti-œstradiol croise à 100 % avec l'œstradiol, 0,7 % avec l'œstrone, 0,55 % avec l'œstriol, 0,007 % avec la 20-hydroxyprogestérone, 0,002 % avec les stéroïdes suivants : la progestérone, la 17 α-hydroxyprogestérone, la prégnenolone, l'androstènedione, la testostérone

et divers glucocorticoïdes tels que la corticostérone et le cortisol. Le coefficient de variation est de 6,40 % intra-essai (n = 10) et de 8,53% inter-essai (n = 10).

5.3 RESULTATS

5.3.1 Effets de l'inhibiteur de l'aromatase

Chez les animaux mâles nés à terme de mères traitées pendant la gestation par l'ATD ou par le solvant, la testostéronémie est plus élevée une heure après la naissance qu'immédiatement après (**figure 13**). La testostéronémie est plus élevée chez les animaux de mères traitées par l'ATD que chez ceux de mères traitées par le solvant, que ce soit juste après la naissance ou une heure plus tard.

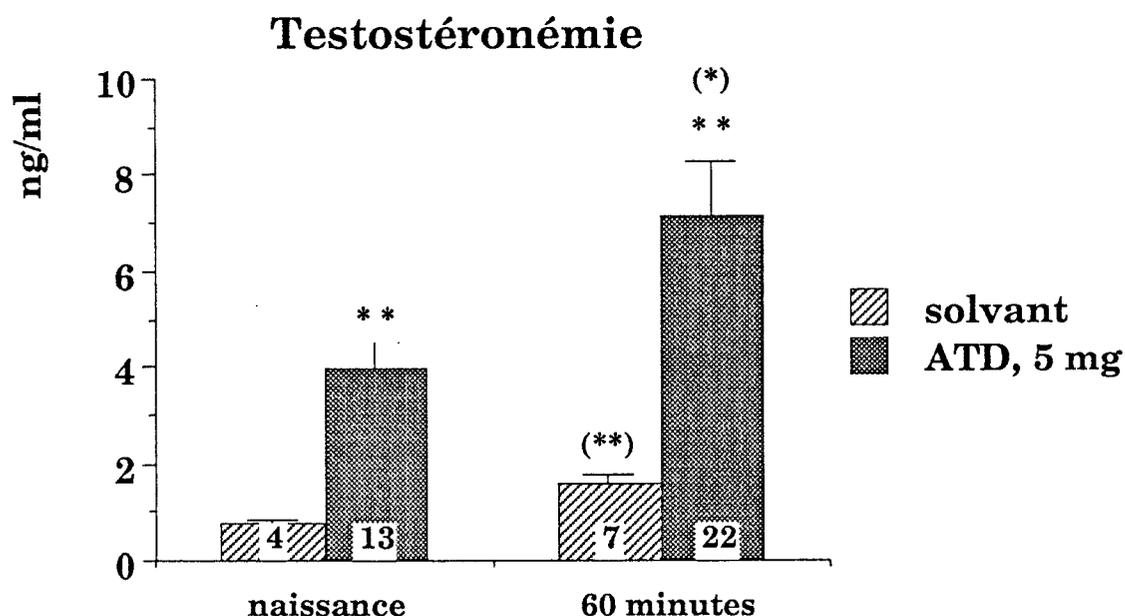


Fig. 13 : Testostéronémie des animaux mâles nouveau-nés dont les mères ont été traitées chaque jour du 17ème au 21ème jour de gestation par un inhibiteur de l'aromatase, l'ATD (5 mg) ou par le solvant. Le prélèvement de sang a été effectué soit immédiatement après la naissance à terme par césarienne, soit une heure après.

Comparaison vs "solvant" : ** (p < 0,01)

Comparaison vs "naissance" : (*) (p < 0,05) et (**) (p < 0,01)

Chez les animaux de 30 jours non stressés, l'ACTHémie est comparable dans les trois groupes suivants : mâles nés de mères traitées par le solvant, mâles et femelles de mères traitées par l'ATD (**figure 14**). Une demi-heure après l'inhalation d'éther, l'ACTHémie des mâles, nés de mères traitées par l'ATD, est significativement plus élevée que celle des animaux de même sexe dont les mères ont été traitées par le solvant ; chez les premiers, l'ACTHémie ne diffère pas significativement de celle observée chez les femelles, nées de mères traitées par l'ATD (**figure 14**).

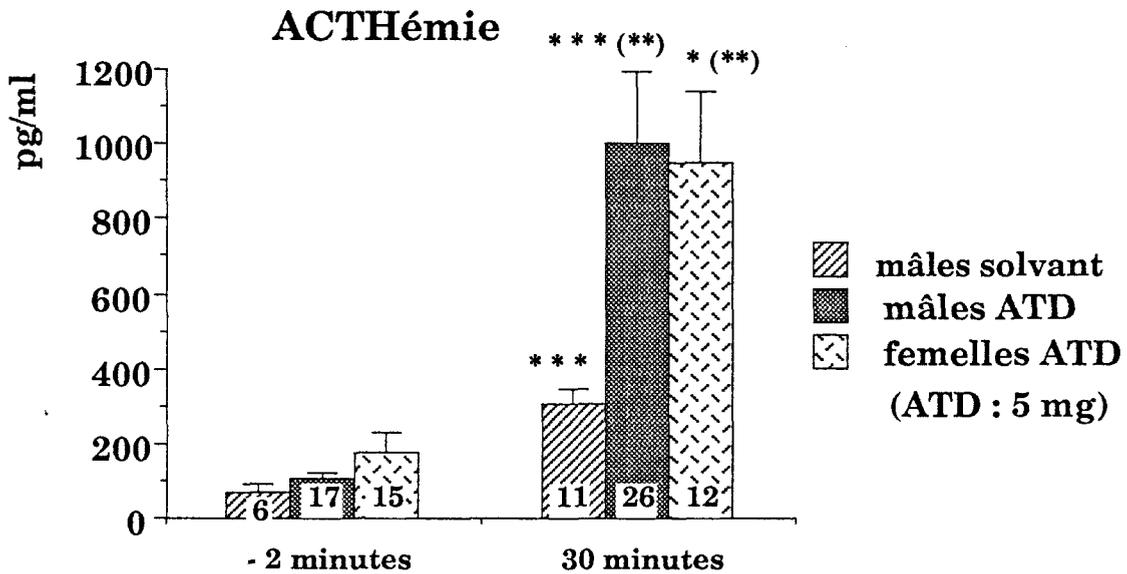


Fig. 14 : ACTHémie des animaux mâles et femelles exposés à l'éther à l'âge de 30 jours après la naissance spontanée à terme de mères traitées chaque jour du 17ème au 21ème jour de gestation par un inhibiteur de l'aromatase, l'ATD (5 mg) ou par le solvant. L'ACTH est dosée soit avant le stress (temps - 2 minutes), soit 30 minutes après.

Comparaison vs "- 2 minutes" : * (p < 0,05) et *** (p < 0,001)

Comparaison vs "mâles solvant" à 30 minutes : (**) (p < 0,01)

Fœtus injectés à J 19 par œstradiol ou solvant

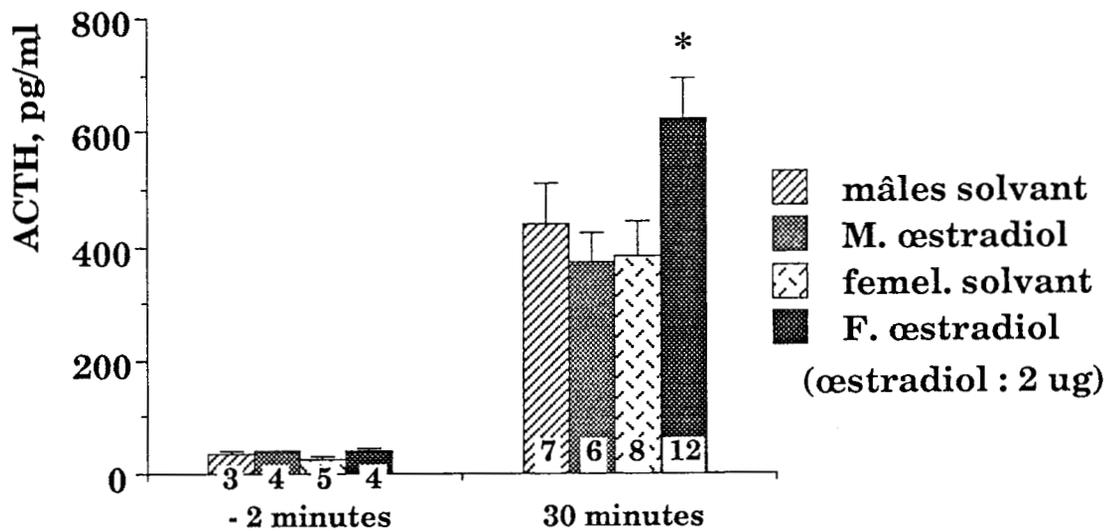


Fig. 15 : ACTHémie des animaux mâles et femelles exposés à l'éther à l'âge de 30 jours et injectés *in utero* au 19ème jour de gestation soit d'œstradiol (2 µg) soit de solvant. L'ACTH est dosée soit avant le stress (temps -2 minutes), soit 30 minutes après.
 Comparaison vs "femelles solvant" à 30 minutes : * (p < 0,05)

5.3.2 Effets de l'œstradiol

Les taux plasmatiques d'œstradiol, avant puis après inhalation d'éther à l'âge de 30 jours, chez les rats injectés *in utero* d'œstradiol ou de solvant, sont rapportés au **Tableau III**. Il apparaît que l'œstradiolémie est comparable dans les différents groupes constitués selon le sexe, le type de traitement, avant ou après stress, à l'exception toutefois des mâles injectés *in utero* de solvant et étudiés après stress. Dans ce dernier groupe, en effet, l'œstradiolémie est significativement plus élevée que chez les mâles traités par l'œstradiol et étudiés après stress. La testostéronémie a également été dosée dans les différents groupes expérimentaux ; les taux sont à chaque fois indétectables ($< 0,2$ ng/ml).

Tableau III. Œstradiolémie (pg/ml) avant ou 30 min. après l'inhalation d'éther chez les rats de 30 jours injectés *in utero* au 19ème jour de gestation soit d'œstradiol (2 ug) soit de solvant.

traitement	solvant		œstradiol	
	avant stress	après stress	avant stress	après stress
mâles	39,6 ± 6,8 (n = 4)	85,4 ± 15,0 (n = 6)	25,4 ± 6,4 (n = 5)	31,4 ± 2,7** (n = 7)
femelles	56,5 ± 8,5 (n = 5)	63,4 ± 8,7 (n = 9)	20,9 ± 3,7 (n = 5)	34,5 ± 4,5 (n = 12)

** : $p = 0,01$ vs les mâles "solvant après stress"

Les effets d'une injection unique d'œstradiol *in utero* aux foetus au 19ème jour de gestation sur la réponse corticotrope au stress à l'éther à l'âge de 30 jours sont présentés à la **figure 15**. L'ACTHémie avant stress est comparable dans les différents groupes expérimentaux (mâles et femelles injectés d'œstradiol ou de solvant avant la naissance). Après le stress, l'ACTHémie est plus élevée dans les différents groupes ; chez les mâles "œstradiol" elle est comparable à celle des mâles et des femelles "solvant" ; chez les femelles "œstradiol", l'ACTHémie est significativement plus élevée que chez les femelles "solvant". En d'autres termes, chez les animaux injectés de solvant pendant la vie foétale, il ne semble plus exister de différence sexuelle dans la réponse au stress éther.

5.4 DISCUSSION

Nos résultats expérimentaux obtenus chez les animaux dont la mère a été traitée par l'ATD au cours de la gestation suggèrent que l'aromatisation de la testostérone endogène en œstrogènes au cours de la vie fœtale influence l'organisation fonctionnelle des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse hypophysaire au stress à l'éther. Ainsi, le traitement de rates gravides par l'ATD réalisé du 17ème au 21ème jour de la gestation, commencé avant que ne survienne chez les mâles le pic prénatal de la testostéronémie (WEISZ et WARD, 1980), n'abolit pas la "crise testiculaire" du nouveau-né, marquée par l'apparition d'un pic postnatal précoce de testostérone plasmatique, mais confère au jeune mâle de 30 jours une réponse corticotrope au stress à l'éther de type femelle.

Nous avons vu que chez les nouveau-nés mâles, nés de mères traitées par l'ATD au cours de la gestation, la testostéronémie mesurée par dosage radioimmunologique est plus élevée que chez ceux de mères traitées par le solvant. Cette différence pourrait s'expliquer soit par un blocage de la conversion de la testostérone en œstradiol chez le fœtus du fait du passage transplacentaire de l'ATD injecté à la mère 3 heures environ avant le sacrifice, soit par une réaction croisée du sérum anti-testostérone avec l'ATD circulante (évaluée à 0,05 %) au cours du dosage radioimmunologique de la testostérone. La vérification de cette deuxième hypothèse impliquerait d'effectuer le dosage de la testostérone après extraction chromatographique des stéroïdes du plasma. Ceci n'a pas été possible dans nos conditions expérimentales en raison du trop faible volume des échantillons sanguins dont nous avons pu disposer (50 à 100 µl).

En injectant *in utero* de l'œstradiol aux fœtus nous pensions obtenir chez les femelles un effet de "déféminisation" du mode de réponse corticotrope au stress à l'éther pratiqué à l'âge de 30 jours. Dans nos conditions expérimentales, nos résultats, non seulement ne confirment pas l'hypothèse formulée en introduction de ce chapitre, mais sont de surcroît en discordance avec ceux obtenus par le traitement par l'ATD. En effet, l'injection d'œstradiol *in utero* ne réduit pas comme on pouvait

s'y attendre l'ACTHémie après le stress chez les femelles ; chez celles-ci en effet, l'ACTHémie est même plus élevée que chez celles traitées *in utero* par le solvant. Ces dernières ont par ailleurs une réponse au stress comparable à celle des mâles injectés d'œstradiol ou de solvant.

Pour tenter d'expliquer cette discordance par rapport aux résultats attendus, on peut avancer les hypothèses suivantes. Premièrement, alors que l'ATD a été administré de façon répétée aux rates gestantes, l'œstradiol n'a été injecté qu'une seule fois aux fœtus, directement à travers la paroi utérine de rates gravides, laparotomisées sous anesthésie à l'éther ; en outre, du fait de la liaison physiologique de l'œstradiol à des protéines circulantes, en particulier l' α -fœtoprotéine, il est possible qu'une seule injection d'œstradiol n'ait pas permis d'atteindre des taux d'œstradiol hypothalamique suffisants pour "déféminiser" la maturation de certaines voies neuroendocriniennes. Deuxièmement on peut remarquer que l'ACTHémie des mâles injectés de solvant dans l'expérience "œstradiol" est, 30 minutes après l'inhalation d'éther, plus élevée que celle des mâles injectés d'œstradiol semblablement stressés dans l'expérience "ATD". En d'autres termes, les premiers ont une réponse "moins masculine" ou "plus féminine". Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la différence sexuelle de la réponse est absente chez les animaux injectés de solvant dans l'expérience "œstradiol". Il est vraisemblable que dans cette dernière expérience, la stimulation de la sécrétion de glucocorticoïdes maternels et fœtaux, liée à l'anesthésie des rates gravides à l'éther, à la laparotomie et à l'injection des fœtus à travers la paroi utérine, soit bien plus grande que lors de l'administration par voie sous-cutanée, même répétée, de solvant à des femelles non anesthésiées et non laparotomisées dans l'expérience "ATD". Or, le stress de la rate gestante déprime la sécrétion prénatale de testostérone chez les fœtus mâles qu'elle porte (WARD et WEISZ, 1980 et 1984). Il en résulte à l'âge adulte une "féminisation" du comportement sexuel des animaux nés de mères stressées. Il pourrait en être de même, d'une certaine façon, pour la réponse corticotrope au stress. Cette hypothèse mériterait d'être soumise à l'épreuve expérimentale. L'injection d'œstradiol par voie sous-cutanée à la mère pendant la gestation pourrait, par contre, éviter, tout au moins dans une certaine mesure, une sécrétion excessive de glucocorticoïdes susceptible de perturber l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire fœtal ;

néanmoins se poseraient d'autres problèmes, en particulier celui de l'interruption prématurée de la gestation.

On peut souligner aussi que l'augmentation de l'ACTHémie sous l'effet du stress chez les femelles est nettement plus faible après traitement *in utero* par l'œstradiol qu'après traitement par l'ATD. Les taux d'ACTH sont en effet environ deux fois plus faibles dans le premier cas que dans le second. Cette différence pourrait tenir au fait qu'il existe chez les fœtus femelles intacts un peu de testostérone circulante. Celle-ci est susceptible d'être convertie en œstradiol, dans une proportion certes infiniment moindre que chez les mâles dont la testostéronémie est bien plus élevée. L'apport aux fœtus femelles d'un inhibiteur de l'aromatase pourrait réduire la production d'œstradiol provenant de la conversion de la testostérone et accentuer chez l'animal de 30 jours *postpartum* le caractère "féminin" de la réponse au stress.

Demeure enfin le problème de savoir pourquoi l'augmentation de l'ACTHémie après stress est plus importante chez les femelles traitées à l'œstradiol que chez celles injectées de solvant. Nous n'avons pas de réponse satisfaisante à cette question.

6. Discussion générale

La fonction corticotrope de l'hypophyse, tout comme la fonction gonadotrope, semble modulée par les hormones sexuelles. En effet, chez le rat, la réponse corticotrope à un stress à l'éther varie selon le sexe.

Le premier but de ce travail a été de rechercher si la différence sexuelle dans la réponse corticotrope à un stress à l'éther, rapportée par HARY et coll. (1981) à l'âge de 8 jours, est toujours présente chez le jeune rat à un stade plus tardif du développement. Le stade de un mois *postpartum* a été choisi pour deux raisons : tout d'abord par ce qu'il est plus facile d'étudier à ce stade qu'à l'âge de 8 jours le déterminisme de la différence sexuelle dans la réponse à un stress à l'éther ; ensuite, parce que à ce stade l'influence des stéroïdes sexuels circulants est certainement très faible. A 30 jours en effet, les animaux sont en phase prépubertaire et le taux des stéroïdes sexuels circulants est très bas ; d'ailleurs, ce taux n'est pas significativement influencé dans les deux sexes par la castration réalisée à 21 jours *postpartum* (résultats inédits). Ainsi, les études réalisées à 30 jours offrent l'opportunité d'apprécier l'éventuelle influence de la sécrétion périnatale des androgènes sur la fonction corticotrope de l'hypophyse plutôt que celle de la sécrétion péripubertaire. Or, la période périnatale constitue une période critique du développement dans la mesure où l'on observe chez le nouveau-né mâle une véritable "crise" testiculaire marquée par une élévation importante, mais fugace, des taux plasmatiques de testostérone.

Dans une première expérience, nous avons confirmé à 30 jours ce que HARY et coll. (1981) ont observé à l'âge de 8 jours : l'ACTHémie, qui s'élève très rapidement et de façon comparable dans les deux sexes juste après l'inhalation d'éther, demeure, dans la demi-heure qui suit, plus élevée chez la femelle que chez le mâle.

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'effet masculinisant de la testostérone sur la réponse corticotrope à l'inhalation d'éther, observé à l'âge de 8 jours par HARY et coll. (1986) chez les femelles injectées à la naissance de testostérone, implique son aromatisation en œstradiol. Pour cela, nous avons traité des femelles à la naissance par l'œstradiol et/ou un anti-œstrogène, le clomifène. Nos résultats montrent qu'une réponse corticotrope de type mâle à l'inhalation d'éther peut être effectivement induite chez la femelle par une injection unique d'œstradiol, à condition qu'elle soit réalisée immédiatement après la naissance. Cette action de

l'œstradiol est donc limitée à une courte période "critique" du développement postnatal.

Nous avons aussi étudié les hormones post-hypophysaires (AVP et ocytocine) -qui potentialisent la sécrétion d'ACTH induite par le CRF- pour savoir si elles peuvent rendre compte, au moins en partie, de la différence sexuelle de réponse à l'inhalation d'éther. Nous avons dosé avant et après stress les taux d'AVP et d'ocytocine dans l'hypothalamus, le lobe neuro-intermédiaire et le plasma périphérique ; nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux sexes. Aussi nous ne confirmons pas les observations de WILLIAMS et coll. (1985) faites chez l'animal adulte. Ces auteurs ont montré en effet une réponse post-hypophysaire au stress par immobilisation, appréciée par l'élévation des taux d'AVP et de d'ocytocine dans le plasma périphérique, plus importante chez la femelle que chez le mâle.

HARY et coll. (1986) ont montré que la castration à la naissance d'animaux délivrés à terme par césarienne, supprime la brusque augmentation postnatale de la testostérone plasmatique sans affecter le type de réponse au stress à l'éther réalisé 8 jours plus tard. En prolongement de ces travaux, nous avons étudié l'influence de la sécrétion fœtale de testostérone dans l'organisation fonctionnelle des structures impliquées dans la réponse hypophysaire au stress. Une telle étude impliquait d'inhiber la sécrétion fœtale de testostérone (expériences avec un anti-GnRH et la dexaméthasone), d'en réduire les effets (expérience avec un inhibiteur de l'aromatase) ou au contraire de mimer ces effets (expérience avec l'œstradiol), suivant l'hypothèse selon laquelle l'action de la testostérone implique sa conversion en œstradiol.

Avant de réaliser cette série d'expériences, nous avons dosé les hormones de l'axe gonadotrope chez le fœtus intact. Nos résultats concernant la testostérone confirment ceux de TURKELSON et coll. (1977), de CORBIER et coll. (1978) et SLOB et coll. (1980) : chez le fœtus mâle, la testostéronémie est plus élevée que chez la femelle et on note un pic de testostérone plasmatique à 19 jours de gestation. Les résultats des dosages de la LH plasmatique et hypophysaire et de la GnRH hypothalamique suggèrent que le rétro-contrôle négatif qu'exerce la testostérone sur la sécrétion de LH, et vraisemblablement aussi sur celle de GnRH, est opérationnel au cours de la gestation. Les traitements pendant la vie

fœtale par l'anti-GnRH et la dexaméthasone abolissent le pic de testostérone plasmatique observé chez les fœtus normaux à 19 jours de gestation ; aussi, le contrôle de la fonction gonadotrope hypophysaire paraît-il s'établir entre 18 et 19 jours de gestation.

L'anti-GnRH et la dexaméthasone freinent efficacement l'activité gonadotrope du fœtus, mais il paraît impossible d'utiliser ces "outils" pharmacologiques pour étudier l'influence de la sécrétion fœtale de testostérone sur la réponse corticotrope au stress à l'éther à 30 jours *postpartum*. En effet, les expériences avec l'anti-GnRH ont nécessité une injection répétée de chaque fœtus et donc de pratiquer à plusieurs reprises une laparotomie des rates gravides ; d'autre part, la dexaméthasone induit une hypotrophie corporelle. Nous avons donc préféré une autre approche : le blocage pharmacologique de l'activité aromatasase fœtale par l'ATD. Cette drogue a été administrée à des rates gravides par voie sous-cutanée, chaque jour du 17ème au 21ème jour de la gestation. Elle n'abolit pas la "crise" testiculaire du rat nouveau-né mais confère au jeune mâle de 30 jours une réponse corticotrope au stress à l'éther de type femelle. Ces résultats suggèrent fortement que l'aromatase de la testostérone endogène en œstrogènes au cours de la vie fœtale influence l'organisation fonctionnelle des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse hypophysaire au stress à l'éther pratiquée un mois *postpartum*. Par contre, nos résultats après injection *in utero* d'œstradiol ne confirment pas cette hypothèse et sont même en discordance avec ceux obtenus avec le traitement par l'ATD. Cette discordance pourrait avoir pour explication, au moins partielle, la différence de modalité d'administration de l'œstradiol par rapport à l'ATD. L'œstradiol a, en effet, été administré en injection unique après anesthésie à l'éther, laparotomie des rates gravides et manipulation des cornes utérines. Une telle procédure est à l'origine d'une stimulation de la sécrétion des glucocorticoïdes fœtaux et maternels ; or, on sait que le stress chez la femelle gestante déprime la sécrétion prénatale de testostérone chez le fœtus mâle et "féminise" son comportement sexuel à l'âge adulte (WARD et WEISZ, 1980 et 1984).

En résumé, il existe une différence sexuelle de réponse corticotrope au stress à l'éther chez le jeune rat ; le type de réponse est

déterminé chez le mâle par la sécrétion fœtale de testostérone tandis que la femelle est encore sensible à la naissance à l'action masculinisante de cet androgène.

Nos résultats suggèrent donc que les hormones sexuelles peuvent avoir une action sur la fonction hypothalamo-hypophysaire qui n'est pas limitée à l'axe gonadotrope. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de WILLIAMS et coll. (1985), qui montrent également une différence de réponse post-hypophysaire au stress chez le rat adulte. Le stress par immobilisation induit en effet une nette augmentation des taux plasmatiques d'AVP et surtout d'ocytocine chez la femelle, alors que chez le mâle il n'y a pas de variation significative des taux d'AVP et ceux d'ocytocine n'augmentent que faiblement (WILLIAMS et coll. 1985). La castration de l'animal adulte ne modifie pas la réponse post-hypophysaire au stress chez la femelle ; la réponse de l'ocytocine est par contre plus forte chez le mâle (WILLIAMS et coll. 1985). Afin de savoir si la différence sexuelle de réponse post-hypophysaire peut faire intervenir les opioïdes, puisque ces derniers modulent la sécrétion des hormones neurohypophysaires, CARTER et LIGHTMAN (1986) ont étudié les effets de la naloxone. Ces auteurs ont observé qu'un tel traitement augmente la réponse post-hypophysaire au stress chez la femelle mais non chez le mâle. Ils ont ensuite prolongé ces travaux suivant la même démarche que nous-mêmes et leurs observations vont dans le même sens que les nôtres : la castration chirurgicale ou pharmacologique (par l'administration d'un anti-GnRH) réalisée 2 à 5 jours après la naissance à terme ne modifie pas la réponse post-hypophysaire au stress chez le mâle adulte tandis que l'injection de testostérone à des femelles saines au même moment de la vie postnatale leur confère à l'état adulte une réponse de type mâle (CARTER et coll. 1988). Dans le même laboratoire, SARIDAKI et coll. (1988) ont enfin étudié les effets d'un inhibiteur de l'activité aromatasase (l'ATD) et de la dihydrotestostérone (DHT), administrés au cours de la gestation. Des rates gravides ont donc été injectées chaque jour du 17ème au 21ème et dernier jour de la gestation ; le traitement par l'ATD ou la DHT a été poursuivi chez les nouveau-nés du 1er au 5ème jour de la vie postnatale. Les animaux des différentes portées ont été soumis au stress par immobilisation à 8-12 semaines chez les mâles et à 12-14 semaines chez les femelles. Après traitement par l'ATD, la réponse de l'AVP au

stress est augmentée chez le mâle. Les auteurs concluent que la testostérone exerce un effet d'organisation sur les voies neuroendocriniennes impliquées dans la différence sexuelle de réponse à ce type de stress *via* sa conversion en œstradiol. On peut ajouter à cette conclusion que ce mode d'action n'est pas exclusif car le traitement par la DHT, qui est un androgène non aromatisable, donne les mêmes résultats chez le mâle que ceux par l'ATD.

Pour notre part, nous n'avons pas observé chez le jeune rat âgé de 30 jours de différence sexuelle concernant les taux d'AVP et d'ocytocine dans le plasma périphérique, le lobe neuro-intermédiaire et l'hypothalamus, avant et après stress par inhalation d'éther. Cela ne dénie pas toutefois l'existence d'une différence sexuelle de sécrétion d'AVP et d'ocytocine car nous n'avons pas dosé ces hormones directement dans le sang porte-hypophysaire. Outre le rôle que jouent directement ces hormones sur la sécrétion d'ACTH, il faut considérer leurs effets de potentialisation sur la réponse corticotrope hypophysaire au CRF. A ce sujet, HARY (1990) a montré que l'hypophyse du nouveau-né mâle ne paraît pas sujette, contrairement à celle de la femelle, à l'effet de potentialisation qu'exerce l'ocytocine sur la sécrétion d'ACTH stimulée par le CRF.

Le (ou les) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les stéroïdes peuvent influencer la fonction corticotrope hypophysaire demeure(nt) à préciser. Soulignons d'emblée qu'une telle analyse des agents modulant la sécrétion d'ACTH pose de grandes difficultés d'interprétation, qui tiennent à plusieurs points : ces agents sont multiples, tout comme leurs sites d'action ; la cinétique d'action varie selon l'agent considéré ; les effets sur le système nerveux central d'un stress dépendent du type de stress et du stade de l'évolution de l'animal ; le sang porte-hypophysaire n'est pas facilement accessible pour le dosage des neurohormones et les études de l'influence des agents modulant leur sécrétion sont donc limitées par cet obstacle ; le problème le plus complexe est, en définitive, de tenter d'intégrer les actions des différents agents, tant les afférences nerveuses du système corticotrope sont nombreuses.

Nous avons déjà discuté l'influence possible de l'AVP et de l'ocytocine sur la fonction corticotrope, dont la sécrétion est modulée par

les hormones sexuelles (SKOWSKY et coll. 1979 ; WILLIAMS et coll. 1985 ; AMICO et coll. 1981). Il faut également mentionner l'influence possible des stéroïdes sexuels sur les amines cérébrales qui modulent la fonction corticotrope (revue *in* HARY, 1990). Enfin, il convient naturellement d'examiner la possibilité d'une action directe des stéroïdes sexuels sur la fonction corticotrope. Il n'y a pas, à notre connaissance, d'argument pour supporter une telle hypothèse. En particulier, on peut rappeler que l'œstradiol et la testostérone ne modifient pas *in vitro* la sécrétion d'ACTH par le lobe antérieur de l'hypophyse (HARY, 1990). Par ailleurs, il n'est pas rapporté dans la littérature d'effet stimulant des stéroïdes sexuels sur l'expression du gène du précurseur de l'ACTH, la pro-opiomélanocortine, au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse.

Les stéroïdes sexuels modulent donc la fonction corticotrope. En outre, les stéroïdes sexuels ont un effet précoce dans la vie périnatale d'organisation fonctionnelle des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse anté- et post-hypophysaire au stress. En effet, les traitements par la testostérone à la naissance chez la femelle et par l'ATD au cours de la vie fœtale chez le mâle, modifient le mode de réponse au stress à l'éther dans la vie postnatale dans un sens non conforme au sexe génétique des animaux. Il est même possible que les stéroïdes sexuels exercent un effet morphogène sur les structures neuroendocriniennes. A ce sujet, TOBET et FOX (1989) ont montré que l'injection d'androgènes à la naissance chez le rat femelle réduit à l'âge adulte le nombre de cellules et de fibres à sérotonine et à catécholamines dans différentes régions du cerveau. Or, ces neurotransmetteurs centraux jouent un rôle certain dans l'activation centrale de la fonction corticotrope hypophysaire dans certaines conditions de stress.

Les données que nous avons présentées concernent le rat. Il serait fort intéressant de savoir si elles peuvent être transposables à d'autres espèces et à l'espèce humaine en particulier. L'observation faite par ROFFI (communication personnelle) d'un pic postnatal de testostéronémie chez le nouveau-né humain apporte un éclairage tout particulier à cette question. Sachant que le stress réduit la testostéronémie dans diverses espèces, dont l'espèce humaine, tant chez l'adulte que chez le fœtus (revue *in* WARD et WEISZ, 1984), on peut se demander si la survenue d'un stress dans la vie périnatale peut orienter tel ou tel type de comportement chez l'adulte dans un sens non conforme au sens génétique. Par extension, on peut s'interroger sur les conséquences possibles de diverses agressions et affections pathologiques en néo-natologie sur les processus de maturation, ainsi que sur les conséquences de la prise en charge thérapeutique de ces affections.

7. Références bibliographiques

ABE, K. & CRITCHLOW, V. (1977)

Effects of corticosterone, dexamethasone and surgical isolation of the medial basal hypothalamus on rapid feed-back control of stress-induced corticotropin secretion in female rats.

Endocrinology, 101, 498-505.

AL-DAMLUJI, S., ROSS, G., TOUZEL, R., PERRETT, D., WHITE, A. & BESSER, G.M. (1988)

Modulation of the actions of tyrosine by α_2 -adrenoreceptor blockade.

Br. J. Pharmacol., 95, 405-412.

AMICO, J.A., SEIF, S.M. & ROBINSON, A.G. (1981)

Oxytocin in human plasma : correlation with neurophysin and stimulation with estrogen.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 52, 988-993.

ANTONI, F.A. (1986)

Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion : advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor.

Endocrinol. Rev., 7, 351-378.

ARNOLD, A.P. & GORSKI, R.A. (1984)

Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system.

Annu. Rev. Neurosci., 7, 413-442.

AUBERT, M.L., BEGEOT, M., WINIGER, B.P., MOREL, G., SIZONENKO, P.C. & DUBOIS, P.M. (1985)

Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats.

Endocrinology, 116, 1565-1576.

BALDWIN, D.M. (1979)

Effects of glucocorticoids on estrogen-dependent luteinizing hormone release in the ovariectomized rat and on gonadotropin secretion in the intact female rat.

Endocrinology, 105, 120-128.

BALDWIN, D.M. & SAWYER, C.H. (1974)

Effects of dexamethasone on LH release and ovulation in the cyclic rat.

Endocrinology, 94, 1397-1403.

BARRETT A.M., HODGES, J.R. & SAYERS, G. (1957)

The influence of sex, adrenalectomy and stress on blood ACTH levels in the rat.

J. Endocrinol., 16, 13.

BENY, J.L. & BAERTSCHI A.J. (1982)

Synthetic corticoliberin needs arginine vasopressin for full corticotropin releasing activity.

Experientia, 38, 1078-1079.

BERAUD, G. (1977)

Evolution suivant l'âge et le sexe de l'ACTH des pars distalis et neurointermedia de l'hypophyse de rats.

C.R. Acad. Sc. Paris. [D], **284**, 377-380.

BLUM, M., ROBERTS, J.L. & WARDLAW S.L. (1989)

Androgen regulation of proopiomelanocortin gene expression and peptide content in the basal hypothalamus.

Endocrinology, **124**, 2283-2288.

BUCKLINGHAM, J.C. (1982)

Effects of adrenocortical and gonadal steroids on the secretion in vitro of corticotrophin and its hypothalamic releasing factor.

J. Endocrinol., **93**, 123-132.

BURLET, A., CHATEAU, M. & CZERNICHOW, P. (1979)

Infundibular localization of vasopressin, oxytocin and neurophysins in the rat ; its relationship with corticotrope function.

Brain Res., **168**, 275-286.

CARTER, D.A. & LIGHTMAN, S.L. (1986)

A sex difference in neonatal secretion of posterior pituitary hormones.

Neuroendocrinol. Lett., **8**, 57-63.

CARTER, D.A., SARIDAKI, E. & LIGHTMAN, S.L. (1988)

Sexual differentiation of oxytocin stress responsiveness : effect of neonatal androgenization, castration and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist.

Acta Endocrinol., **117**, 525-530.

CHATELAIN, A. & CHEONG, H.S. (1986)

Immunoreactive forms of ACTH released by the adenohypophysis of the rat during the perinatal period. In vivo and in vitro studies.

J. Physiol. (Paris), **81**, 361-367.

CHATELAIN, A. & CHEONG, H.S. (1987)

The biological activity of the different molecular forms of ACTH on corticosterone production by perfused fetal rat adrenal glands in vitro.

Acta Endocrinol., **116**, 179-185.

CHATELAIN, A., DUPOUY, J.P. & ALLAUME, P. (1980)

Fetal-maternal adrenocorticotrophin and corticosterone relationships in the rat : effects of maternal adrenalectomy.

Endocrinology, **106**, 1297-1303.

CHOWEN-BREED, J., FRASER, H.M., VICIAN, L., DAMASSA, D.A., CLIFTON, D.K. & STEINER, R.A. (1989)

Testosterone regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus of the male rat.

Endocrinology, **124**, 1697-1702.

CORBIER, P., KERDELHUE, B., PICON, R. & ROFFI, J. (1978)
Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat.
Endocrinology, **103**, 1985-1991.

CORBIER, P. RHODA, J., KERDELHUE, B. & ROFFI, J. (1981)
Augmentation de la testostérone endogène dans l'hypothalamus du rat mâle à la naissance.
C.R. Acad. Sc. Paris [III], **292**, 413-416.

COYNE, M.D. & KITAY, J.I. (1969)
Effect of ovariectomy on pituitary secretion of ACTH.
Endocrinology, **85**, 1097-1102.

COYNE, M.D. & KITAY, J.I. (1971)
Effect of orchietomy on pituitary secretion of ACTH.
Endocrinology, **89**, 1024-1028.

DAIKOKU, S., KAWANO, H. & ABE, K. (1980)
Studies on the development of hypothalamic regulation of the hypophysial activity in rats.
Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp., **69**, 1-6.

DAIKOKU, S., KAWANO, H. & WAKABAYASHI, K. (1981)
Studies on the development of hypothalamic regulation of the hypophysial gonadotropic activity in rats.
Experientia, **37**, 1346-1347.

DOERR, P. & PIRKE, K.M. (1976)
Cortisol-induced suppression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells in vitro.
Endocrinology, **43**, 622-629.

DUPOUY, J.P. & CHATELAIN, A. (1987)
Fetal development of corticostimulating function in mammals
Exp. Clin. Endocrinol. (Life Sci. Adv.), **6**, 175-184.

DUPOUY, J.P. & JOST, A. (1970)
Hypothalamus et fonction corticostimulante de l'hypophyse fœtale du rat : influence de l'hypothalamus et des corticostéroïdes.
C. R. Séanc. Soc. Biol., **164**, 2422-2427.

EUKER, J.S., MEITES, J. & RIEGLE, G.D. (1975)
Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated rats.
Endocrinology, **96**, 85-92.

EVAIN, D., MORERA, A.M. & SAEZ, J.M. (1976)
Glucocorticoids receptors in interstitial cells of the rat testis.
J. Steroid Biochem., **7**, 1135-1139.

FELDMAN, S.C. & BLOCH, E. (1978)

Developmental pattern of testosterone synthesis by fetal rat testes in response to luteinizing hormone.

Endocrinology, 102, 999-1007.

FULLER, R.W. (1981)

Serotonergic stimulation of pituitary-adrenocortical function in rats.

Neuroendocrinology, 32, 118-127.

GEORGE, F.W. & OJEDA, S.R. (1982)

Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development.

Endocrinology, 111, 522-529.

GIBBS, D.M. (1984)

Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress.

Life Sci., 35, 487-491.

GIBBS, D.M. (1985)

Measurement of corticotropin-releasing factors in hypophysial portal blood.

Federation Proc., 44, 203-206.

GIBBS, D.M. (1986)

Vasopressin and oxytocin : hypothalamic modulators of the stress response. A review.

Psychoneuroendocrinology, 11, 131-140.

GIBBS, D.M. & VALE, W. (1982)

Presence of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in hypophysial portal blood.

Endocrinology, 111, 1418-1420.

GILLIES, G.E., LINTON, E.A. & LOWRY, P.J. (1982)

Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin.

Nature, 222, 355-357.

GOGAN, F., SLAMA, A., BIZZINI-KOUTZNETZOVA, B., DRAY, F. & KORDON, C. (1981)

Importance of the perinatal testosterone in sexual differentiation in the male rat.

J. Endocrinol., 91, 75-79.

GORSKI, R.A. & WAGNER, J.W. (1965)

Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus.

Endocrinology, 76, 1126-1128.

GRAY, P. (1971)

Pituitary-adrenocortical response to stress in the neonatal rat.

Endocrinology, 89, 1126-1128.

HABERT, R. & PICON, R. (1981)

Activité gonadotrope circulante chez le fœtus de rat en fin de gestation : niveau, origine et rôle dans le contrôle de la stéroïdogénèse testiculaire.
J. Physiol (Paris), **77**, 19A.

HABERT, R. & PICON, R. (1982)

Control of testicular steroidogenesis in foetal rat : effect of decapitation on testosterone and plasma luteinizing hormone-like activity.
Acta Endocrinol., **99**, 466-476.

HABERT, R. & PICON, R. (1984)

Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 β levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat.
J. Steroid. Biochem., **21**, 193-198.

HARY, L. (1990)

Contrôle multifactoriel de la fonction corticotrope de l'hypophyse du rat nouveau-né.
Thèse de Doctorat, Lille 1.

HARY, L., DUPOUY, J.P. & CHATELAIN, A. (1981)

Pituitary response to bilateral adrenalectomy, metyrapone treatment and ether stress in the newborn rat.
Biol. Neonate, **39**, 28-36.

HARY, L., DUPOUY, J.P. & GREGIORE I. (1986)

Effects of castration and testosterone on the pituitary and adrenal response of the newborn rat to ether inhalation.
Neuroendocrinology, **42**, 137-142.

HUHTANIEMI, I.T. & CATT, K.J. (1985)

Effects of gonadotropin-releasing hormone receptor blockade on rat testicular gonadotropin and lactogen receptors, steroidogenesis and responses to human chorionic gonadotropin stimulation.
Endocrinology, **116**, 281-287.

HUTCHISON, J.B. & STEIMER T.J. (1986)

Formation of behaviorally effective 17 β -estradiol in the dove brain : steroid control of preoptic aromatase.
Endocrinology, **118**, 2180-2187.

HUTCHISON, J.B., STEIMER T. & HUTCHISON R.E. (1986)

Formation of behaviorally active estrogen in the dove brain : induction of preoptic aromatase by intracranial testosterone.
Neuroendocrinology, **43**, 416-427.

JONES, M.T. & GILLHAM, B. (1988)

Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/ β -lipotropic hormone.
Physiol. Rev., **68**, 743-818.

KELLER-WOOD, M.E. & DALLMAN, M. F (1984)

Corticosteroid inhibition of ACTH secretion.

Endocrinol. Rev., **5**, 1-24.

KITAY, J.I. (1961)

Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat.

Endocrinology, **68**, 818-824.

LABRIE, F., GIGUERE, V., MEUNIER, H., SIMARD, J., GOSSARD, F. & RAYMOND, V. (1987)

Multiple factors controlling ACTH secretion at the anterior pituitary level.

Ann. N.Y. Acad. Sci., **512**, 97-114.

LE MEVEL, J.C., ABITBOL, S., BERAUD, G. & MANIEY, J. (1978)

Dynamic changes in plasma adrenocorticotrophin after neurotropic stress in male and female rats.

J. Endocrinol., **76**, 359-360.

LE MEVEL, J.C., ABITBOL, S., BERAUD, G. & MANIEY, J. (1979)

Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats.

Endocrinology, **105**, 812-817.

LE MEVEL, J.C., BERAUD, G. & MANIEY, J. (1982)

Activité corticohypophysiotrope et corticotrope chez le rat après une agression psychique : effets du sexe et de la surrénalectomie.

J. Physiol. (Paris), **78**, 179-185.

LESCOAT, G. (1981)

Réponses corticotrope et gonadotrope à une agression neurotrophe chez le rat mâle entier ou castré à la naissance. Influence de la surrénalectomie.

C.R. Acad. Sci. [III], **292**, 603-608.

LESCOAT, G. (1984)

Corticotrophin response to neurotropic stress in the male rat : influence of postnatal castration and adrenalectomy.

IRCS Med. Sci., **12**, 146-147.

LESCOAT, G., JEGO, P., BERAUD, G. & MANIEY, J. (1970)

Influence du sexe sur les modalités de réponse de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien aux agressions émotionnelles et somatiques chez le rat.

C.R. Soc. Biol. (Paris), **164**, 2106-2113.

LESCOAT, G., JEGO, P. & MANIEY, J. (1971)

Influence des hormones sexuelles sur l'intensité de la réponse du complexe hypothalamo-hypophysio-surrénalien à une agression émotionnelle chez le rat.

J. Physiol. (Paris), **63**, 17-18.

LIEBERBURG, I. & MAC EWEN, B.S. (1975)

Estradiol-17 β : a metabolite of testosterone recovered in cell nuclei from limbic areas of neonatal rat brains.

Brain Res., **85**, 165-170.

- MAC ADAMS, M.R., WHITE, R.H. & CHIPPS, B.E. (1986)**
Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy.
Ann. Intern. Med., **104**, 648-651.
- MALENDOWICZ, L.K., STACHOWIAK, A. & ZABEL, M. (1987)**
Sex differences in adrenocortical structure and function.
Exp. Clin. Endocrinol., **1**, 1-8.
- MANIEY, J., LESCOAT, G., LANOE, J., ROCHCONGAR, P. & DROUET, A.M. (1975)**
Rôle des gonades dans la maturation de la fonction corticotrope chez le rat.
C.R. Acad. Sc. [D], **280**, 2575-2578.
- MATT, D.W. & MAC DONALD, G.J. (1984)**
In vitro progesterone and testosterone production by the rat placenta during pregnancy.
Endocrinology, **115**, 741-747.
- MATWIJIW, I. & FAIMAN, C. (1987)**
Effect of gonadotropin-releasing hormone on circulating levels of immunoreactive luteinizing hormone secretion.
Neuroendocrinology, **121**, 347-351.
- MEIDAN, R., LIM, P., MAC ALLISTER J.M. & HSUEH, A.J.W. (1985)**
Hormonal regulation of androgen synthesis by primary culture of testis cells from neonatal rats.
Endocrinology, **116**, 2473-2482.
- NAFTOLIN, F., RYAN, K.J., DAVIES, I.J., REDDY, V.V., FLORES, F., PETRO, Z., KUHN, M., WHITE, R.J., TAKAOKA, Y. & WOLIN, L. (1975)**
The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues.
Recent Prog. Horm. Res., **31**, 295-319.
- NOUMURA, T., WEISZ, J. & LLOYD, C.W. (1966)**
In vitro conversion of 7-³H-progesterone to androgens by the rat testis during the second half of fetal life.
Endocrinology, **78**, 245-253.
- PADMANABHAN, V., KEECH, C. & CONVEY, E.M. (1983)**
Cortisol inhibits and adrenocorticotropin has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro.
Endocrinology, **112**, 1782-1787.
- PANG, S.F., CAGGIULA, A.R., GAY, V.L., GOODMAN, R.L. & PANG, C. S. F. (1979)**
Serum concentration of testosterone, oestrogens, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male and female rats during the critical period of neural sexual differentiation.
J. Endocrinol., **80**, 103-110.

PERAKIS, A. & STYLIANOPOULOU, F. (1986)

Effects of prenatal androgen peak on rat brain sexual differentiation.
J. Endocrinol., **108**, 281-285.

PICON, R. (1976)

Testosterone secretion by foetal rat testes in vitro.
J. Endocrinol., **71**, 231-238.

PICON, R. & GANGNERAU, M.N. (1979)

Acquisition of sensitivity to LH in relation to fetal development. Stimulation by cyclic AMP and testosterone production in the rat testis.
Mol. Cell. Endocrinol., **18**, 137.

PLOTSKY, P.M. (1987)

Regulation of hypophysiotropic factors mediating ACTH secretion.
Ann. N.Y. Acad. Sci., **512**, 205-217.

RAESIDE, J.L., ROBINSON, D.I. & NAOR, Z. (1984)

Effects of gonadotrophin-releasing hormone on testosterone secretion by fetal and neonatal rat testes in vitro.
Mol. Cell. Endocrinol., **37**, 191-196.

RAYNAUD, J.P., MERCIER-BODARD, C. & BAULIEU, E.E. (1971)

Rat estradiol binding plasma protein (EBP).
Steroids, **18**, 767-788.

REDEKOPP, C., LIVESEY, J.H., SADLER, W. & DONALD, R.A. (1986)

The physiological significance of arginine vasopressin in potentiating the response to corticotrophin-releasing factor in sheep.
J. Endocrinol., **108**, 309-312.

REDDY, V.V.R., NAFTOLIN, F. & RYAN, K.J. (1974)

Conversion of androstenedione to estrone by neural tissues from fetal and neonatal rats.
Endocrinology, **94**, 117-121.

REES, H.D., STUMPF, W.E., SAR, M. & PETRUSZ, P. (1977)

Autoradiographic studies of ³H-dexamethasone uptake by immunocytochemically characterized cells of the rat pituitary.
Cell Tissue Res., **182**, 347-356.

RHODA, J., CORBIER, P., ROFFI, J., CASTANIER, M & SCHOLLER, R. (1983)

Elévation du taux d'oestradiol dans l'hypothalamus du rat mâle à la naissance.
C.R. Acad. Sci. [III], **296**, 405-408.

RHODA, J., CORBIER, P. & ROFFI, J. (1984)

Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth : aromatization of testosterone to 17 β -estradiol.
Endocrinology, **114**, 1754-1760.

RINGSTROM, S.J. & SCHWARTZ, N.B. (1985)

Cortisol suppresses the LH by not the FSH response to gonadotropin-releasing hormone after orchidectomy.

Endocrinology, 116, 472-474.

RIVIER, C. & WALE, W. (1985)

Effect of the long-term administration of corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal and pituitary-gonadal axis in the male rat.

J. Clin. Invest., 75, 689-694.

ROFFI, J., CORBIER, P. & KERDELHUE, B. (1977)

Stimulation de la sécrétion de LH et de FSH et augmentation du poids testiculaire à la naissance chez le rat.

C.R. Acad. Sc. [D], 284, 1313-1316.

ROSELLI, C.E. & RESKO, J.A. (1984)

Regulation of brain aromatase activity in rats.

Endocrinology, 114, 192-200.

ROSELLI, C.E., ELLINWOD, W.E., RESKO, J.A. (1984)

Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism.

Endocrinology, 114, 2183-2189.

ROSEN, H., JAMEEL, M.L. & BARKAN, A.L. (1988)

Dexamethasone suppresses gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion and has no direct pituitary effects in male rats : differentiating regulation of GnRH receptor and gonadotropin response to GnRH.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 67, 1068-1073.

SALISBURY, R.L., KAWANO, H. & WEISZ J. (1982)

Effect of gonadotropin-releasing hormone on circulating levels of immunoreactive luteinizing hormone in fetal rats.

Neuroendocrinology, 35, 265-269.

SANYAL, M.K. & VILLEE, C.A. (1977)

Stimulation of androgen biosynthesis in fetal rat testes in vitro by gonadotropins.

Biol. Reprod., 16, 174-181.

SAPOLSKY, R.M. (1985)

Stress-induced suppression of testicular function in the wild-baboon : role of glucocorticoids.

Endocrinology, 116, 2273-2278.

SARIDAKI, E., CARTER D.D. & LIGHTMAN, S.L. (1988)

Effect of neonatal treatment with aromatase inhibitor and dihydrotestosterone on stress induced vasopressin release.

J. Endocrinol., 119 (suppl.), abstract n° 105.

SCHAISSON, G., DURAND, F. & MOWSOWICZ, I. (1978)

Glucocorticoids receptors in interstitial cells of the rat testis.

J. Steroid Biochem., 7, 1135-1139.

SHARPE, R.M. & COOPER, I. (1982)

The mode of action of LHRH agonists on the rat Leydig cells.

Mol. Cell. Endocrinol., 27, 199-211.

SHARPE, R.M. & COOPER, I. (1987)

Comparison of the effects on purified Leydig cells of four hormones (oxytocin, vasopressin, opiates and LHRH) with suggested paracrine roles in the testis.

J. Endocrinol., 113, 89-93.

SHOLL, S.A. , GOY, R. & KIM, K.L. (1989)

5 α -reductase, aromatase, and receptor levels in the monkey brain during fetal development.

Endocrinology, 124, 627-634.

SKOWSKY, W.R., SWAN, L. & SMITH, P. (1979)

Effects of sex steroid hormones on arginine vasopressin in intact and castrated male and female rats.

Endocrinology, 104, 105-108.

SLOB, A.K., OOMS, M.P. & VREEBURG, J. T. M. (1980)

Prenatal and early postnatal sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats.

J. Endocrinol., 87, 81-87.

SPINEDI, E., HERRERA, L. & CHISARI, A. (1988)

Angiotensin II (A II) and adrenocorticotropin release : modulation by estradiol of the A II biological activity and binding characteristics in anterior pituitary dispersed cells.

Endocrinology, 123, 641-646.

STYLIANOPOULOU, F. (1983)

Effect of maternal adrenocorticotropin injections on the differentiation of sexual behavior of the offspring.

Hormones and Behavior, 17, 324-331.

SUTER, D.E., & SCHWARTZ, N.B. (1985a)

Effects of glucocorticoids on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells in vitro.

Endocrinology, 116, 472-474.

SUTER, D.E., & SCHWARTZ, N.B. (1985b)

Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin hormone by male rat pituitary cells in vitro.

Endocrinology, 117, 849-854.

SUTER, D.E., SCHWARTZ, N.B. & RINGSTROM, S.J. (1988)

Dual role of glucocorticoids in regulation of pituitary content and secretion of gonadotropins.

Am. J. Physiol., 254, E595-E601.

TANG, F. & PHILLIPS, J.G. (1977)

Pituitary-adrenal response to ether stress in the neonatal rat.
J. Endocrinol., 7 5, 183-184.

TELEGDY, G., SCHREIBERG, G. & ENDROCZI, É. (1964)

Effect of oestrogens implanted into the hypothalamus on the activity of the pituitary-adrenocortical system.
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 2 5, 229-234.

TILBOT, R.E. & CHILDS, G.V. (1985)

Cytochemical and cytophysiological studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) target cells in the male rat pituitary : differential effects of androgens and corticosterone on GnRH binding and gonadotropin release.
Endocrinology, 1 1 7, 397-404.

TOBET, S.A. & FOX T.O. (1989)

Androgen regulation of an antigen expressed in regions of developing braisten monoaminergic cell groups.
Dev. Brain Res., 4 6, 253-261.

TOBET, S.A., SHIM, J.H., OSIECKI, S.T., BAUM, M.J., & CANICK, J.A. (1985)

Androgen aromatization and 5 α -reduction in ferret brain during perinatal development : effects of sex and testosterone manipulation.
Endocrinology, 1 1 6, 1869-1878.

TURKELSON, C.M., DUNLAP, J.L., MAC PHEE, A.A. & GERALL, A.A. (1977)

Assay of perinatal testosterone and influence of anti-progesterone and theophylline on induction of sterility.
Life Sci., 2 1, 1149-1158.

TURKELSON, C.M., THOMAS, C.R., ARIMURA, A., CHANG, D., CHANG, J.K. & SHIMIZU, M. (1982)

In vitro potentiation of the activity of synthetic ovine corticotropin-releasing factor by arginine vasopressin.
Peptides, 3, 111-113.

VITO, C.C. & FOX, T.O. (1982)

Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain.
Dev. Brain Res., 2, 97-100.

WARD, I.L. (1972)

Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males.
Science, 1 7 5, 82-84.

WARD, I.L. & WEISZ, J. (1980)

Maternal stress alters plasma testosterone in fetal rats.
Science, 2 0 7, 328-329.

WARD, I.L., & WEISZ, J. (1984)

Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers.
Endocrinology, 114, 1635-1644.

WARREN, D.W., HALTMEYER, G.C. & EIK-NES, K.B. (1973)

Testosterone in the fetal rat testis.
Biol. Reprod., 8, 560-565.

WARREN, D.W., HALTMEYER, G.C. & EIK-NES, K.B. (1975)

The effect of gonadotrophins on the fetal and neonatal rat testis.
Endocrinology, 96, 1226-1229.

WARREN, D.W., HUHTANEIMI, I.T., TAPANAINEN, J., DUFFAU, M.L. & CATT, K.J. (1984)

Ontogeny of gonadotropin receptor in the fetal and neonatal rat testis.
Endocrinology, 114, 470-476.

WEISZ, J., BROWN, B.L. & WARD, I.L. (1982)

Maternal stress decreases steroid aromatase activity in brains of male and female fetuses.
Neuroendocrinology, 35, 374-379.

WEISZ, J. & WARD, I.L. (1980)

Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring.
Endocrinology, 106, 306-316.

WILCOX, J.N. & ROBERTS, J.L. (1985)

Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid level.
Endocrinology, 117, 2392-2396.

WILLIAMS, T.D.M., CARTER, D.A. & LIGHTMAN, S.L. (1985)

Sexual dimorphism in the posterior pituitary response to stress in the rat.
Endocrinology, 116, 738-740.



SEXUALISATION PERINATALE DE LA REPONSE CORTICOTROPE AU STRESS CHEZ LE RAT

Résumé

Chez le rat, la réponse corticotrope à l'inhalation d'éther à l'âge de 8 jours diffère selon le sexe : l'augmentation de l'ACTHémie est plus éphémère chez le mâle que chez la femelle. L'administration de testostérone à la naissance confère aux femelles âgées de 8 jours une réponse corticotrope de type mâle.

A partir de ces observations, nous avons recherché :

- si la différence sexuelle de réponse au stress à l'éther est toujours présente à l'âge de 1 mois, où il sera *a priori* plus facile d'étudier le déterminisme de cette différence sexuelle ;
- si l'effet masculinisateur de la testostérone sur la réponse hypophysaire au stress à l'éther implique son aromatisation en œstradiol. Pour cela, nous avons injecté de l'œstradiol et/ou un anti-œstrogène, le clomifène, à des femelles au moment de la naissance ;
- si la sécrétion fœtale de testostérone détermine le mode de réponse corticotrope au stress à l'éther dans la vie postnatale. Ce problème a été abordé selon trois approches : 1) en inhibant la sécrétion fœtale de testostérone par un antagoniste de la GnRH et par la dexaméthasone ; 2) en tentant de bloquer les effets centraux de la sécrétion fœtale de testostérone par un inhibiteur de l'activité aromatasase (l'ATD) ; 3) en tentant enfin de mimer les effets de la testostérone en injectant de l'œstradiol aux fœtus *in utero*, suivant l'hypothèse selon laquelle l'action de la testostérone implique son action *via* son aromatisation.

Nos résultats montrent que :

- la différence sexuelle de réponse au stress à l'éther existe bien à l'âge de 30 jours ;
- une réponse de type mâle au stress à l'éther peut être induite chez la femelle par une injection d'œstradiol, à condition qu'elle soit faite immédiatement après la naissance ;
- un anti-GnRH et la dexaméthasone freinent la fonction gonadotrope, dont le contrôle central est établi entre le 18ème et le 1ème jour de la gestation. Le traitement des rates gravides par l'ATD (du 17ème au 21ème jour de la gestation) confère aux mâles de 30 jours une réponse corticotrope au stress à l'éther de type femelle. Le traitement des fœtus par l'œstradiol ne réduit pas, par contre, l'ACTHémie après stress chez les femelles de 30 jours. Cette discordance par rapport aux résultats attendus avec l'œstradiol pourrait tenir, au moins en partie, au mode d'administration (injection unique aux fœtus à travers la paroi utérine des mères anesthésiées et laparotomisées) et aux conséquences sur la fonction corticotrope postnatale de la stimulation de la sécrétion des glucocorticoïdes maternels et fœtaux libérés au cours de ces opérations.

En conclusion, les stéroïdes sexuels interviennent au cours de la vie périnatale dans l'organisation fonctionnelle, et peut-être morphologique, des structures neuroendocriniennes impliquées dans la réponse corticotrope au stress à l'éther.