

Posters primés au X^e Congrès de la SALF, Nîmes, octobre 1992

Recherche de mutations dans le gène de la Mucoviscidose : étude de l'ADN de 9 patients avec une agénésie bilatérale des canaux déférents.

MARIE DESGEORGES, PAULE KJELLBERG, P. COSTA, HENRI NAVRATIL, JACQUES DEMAÏLLE,
MIREILLE CLAUSTRES

*Laboratoire de Biochimie Génétique / INSERM u249 / CNRS UPR 9008. Institut de Biologie.
Bd Henri IV. 34060 Montpellier*

Les progrès de la génétique moléculaire ont rendu possible l'étude directe des gènes au niveau de la molécule d'ADN. De très récentes découvertes viennent d'attirer l'attention sur les relations pouvant exister entre certaines altérations du gène responsable de la mucoviscidose et l'absence congénitale bilatérale des canaux déférents, chez des patients de sexe mâle ne présentant par ailleurs aucune des manifestations caractéristiques de la mucoviscidose.

La découverte que l'agénésie bilatérale des canaux déférents, transmise sur le mode récessif autosomique, constitue vraisemblablement un phénotype génital de la mucoviscidose pose le problème de l'évaluation du risque de transmission de la mucoviscidose à la descendance puisque l'épouse du patient a un risque 1/25 d'être hétérozygote, et qu'il est maintenant possible de recourir à une FIV par le sperme épидидymaire.

Nous avons entrepris l'étude de l'ADN de 9 patients dont le motif de consultation était strictement un problème de stérilité. Deux types d'analyse sont réalisés:

1° - Recherche des mutations du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator) préalablement reconnues fréquentes dans la population du Languedoc-Roussillon.

2° - L'objectif à long terme est d'explorer totalement la séquence codante du gène, exon après exon (il en comprend 27, soit 4500 nucléotides à "screener"), par la technique SSCP, à la recherche de mutations inconnues.

Nous présentons les résultats provisoires des premiers mois de travail:

Patient	N° de chromosomes	Mutations identifiées	exon
9	18	3 ΔF508	1 0
		1 G542X	1 1
		1 R347H	7

Pour l'instant, les deux gènes mutés ont été identifiés pour un seul patient: il porte la délétion ΔF508 sur un chromosome, et la substitution R347H sur l'autre.

D'autres types d'études seront cependant nécessaires pour affirmer que la mutation R347H est pathogène, bien que plusieurs arguments permettent de le penser.

Dans tous les cas où une mutation pathogène a été découverte, il est impératif de tester la fratrie du patient puisque le risque d'hétérozygotie est de 2/3.

Augmentation de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig humaines adultes *in vitro* lors de la coculture avec les cellules de Sertoli humaines

H. LEJEUNE, M. SKALLI, P. SANCHEZ, O. AVALLET, J.M. SAEZ

Hôpital Debrousse, 69322 Lyon.

Une méthode de culture a été développée pour étudier les interactions cellules de Leydig-cellules de Sertoli, dans l'espèce humaine. Les testicules ont été prélevés chez 6 hommes adultes jeunes (17-45 ans) en état de mort cérébrale, lors des prélèvements d'organes pour transplantation. Après digestion par la collagénase, les cellules de Leydig ont été purifiées sur gradients discontinus de Percoll. Deux types de cellules de Leydig L2 et L3, différant par leur densité ($1,05 < L2 < 1,06$ and $1,06 < L3 < 1,08$) ont été obtenus. Des préparations enrichies en cellules de Sertoli ont été obtenues à partir de fragments de tubes séminifères après traitement par un tampon glycine pour éliminer les cellules péritubulaires, une seconde digestion à la collagénase et à la hyaluronidase, une fragmentation mécanique et des lavages pour éliminer les cellules germinales. Les cellules de Leydig ont été cultivées seules ou en présence de cellules de Sertoli dans des boîtes de culture recouvertes de Laminine et de Fibronectine, dans un milieu chimiquement défini, sans sérum. L'influence de la coculture sur la sécrétion basale de testostérone a été étudiée sur 3 périodes successives de 48 heures. Pendant les périodes de culture 0-48h, 48-96h et 96-144h, la sécrétion de testostérone (ng/10⁶ cellules de Leydig, $m \pm sem$) a été respectivement $9,7 \pm 2,1$; $6,1 \pm 2,1$ et $3,4 \pm 1,3$ pour les cellules de Leydig L2, $81,6 \pm 16,3$; $82,6 \pm 23,1$ et $39,1 \pm 13,6$ pour les cellules de Leydig L3,

$19,0 \pm 4,6$; $44,0 \pm 8,0$ et $154 \pm 69,3$ pour les cocultures L2+Sertoli (S) et $124,4 \pm 13,2$, $199,2 \pm 14,7$ et $346,1 \pm 78,4$ pour les cocultures L3+S. Ces résultats montrent que 1) Les cellules de Leydig L3 (les plus denses) sécrètent plus de testostérone que les cellules L2, qu'elles soient cultivées en présence ou en absence de cellules de Sertoli, 2) à toutes les périodes, la coculture avec des cellules de Sertoli augmente la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig L2 et L3, 3) pendant la culture, la sécrétion de testostérone diminue quand les cellules de Leydig sont cultivées seules et augmente quand les cellules de Leydig sont cultivées avec les cellules de Sertoli. En présence d'hCG ($10^{-10}M$), la sécrétion de testostérone est stimulée pendant les 48 premières heures. La réponse à l'hCG disparaît ensuite dans tous les types de culture. Ces résultats montrent un effet stimulant, reproductible, augmentant avec le temps de culture, des cellules de Sertoli humaines adultes sur la sécrétion de testostérone des cellules de Leydig humaines adultes. Nous concluons que des cultures de cellules de Leydig et de Sertoli peuvent être réalisées à partir de testicules prélevés chez des hommes jeunes et que dans ce système de culture, les cellules de Sertoli stimulent la sécrétion de testostérone à long terme. Cette étude est en faveur d'un contrôle des fonctions des cellules de Leydig par les cellules de Sertoli dans le testicule humain.

Nombre de spermatozoïdes inséminés et résultats des inséminations intra-utérines (I.I.U) dans les hypofertilités masculines : étude rétrospective de 178 cas

O. LACROIX, A. NOIZET, S. OLIVIER, B. GUDICELLI, M. GAMERRE, J.M. GRILLO

Centre de PMA du CHU Belle-de-mai - 23, rue F. Simon 13003 - MARSEILLE

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- 178 I.I.U. (84 couples) réalisées pour hypofertilité masculine (O.A.T. très sévères exclues).
- I.I.U. ; effectuée selon un protocole précis de stimulation, monitoring et déclenchement de l'ovulation ; insémination (40 h après le déclenchement) de 0,15ml de sperme préparé par centrifugation sur gradient de Percoll (gradient de 6 fractions ; récupération de la fraction 100%±90%).

RÉSULTATS

- 20 grossesses cliniques ont été obtenues soit 11,2% par tentative et 23,8% par couple.
- Pas de grossesse lorsque moins de 300 000 spermatozoïdes mobiles inséminés.
- La plupart des grossesses ont été obtenues après insémination de plus de 750 000 spermatozoïdes mobiles progressifs.

CONCLUSION

Dans les hypofertilités masculines, le choix entre I.I.U. et F.I.V. est encore difficile, d'après les seuls résultats du spermogramme. Le traitement du sperme par Percoll a montré son efficacité en F.I.V. dans les O.A.T. même importantes, la CGP étant actuellement une des techniques permettant de récupérer le maximum de spermatozoïdes mobiles et normaux. Dans les O.A.T. modérées ou plus sévères, un bon rendement au Percoll orientera en première intention vers une I.I.U. (en fonction du contexte clinique), un mauvais rendement au Percoll signe probablement une altération du sperme non décelable par les tests classiques et une F.I.V. doit être proposée, notre étude montrant l'inefficacité des I.I.U. dans ces cas. Le test au Percoll pourrait être inclus dans le bilan d'une hypofertilité masculine, afin de mieux guider notre conduite thérapeutique.

Mise en évidence de l'effet facilitant du moxisylyte sur la réponse érectile à la stimulation sexuelle : étude en double insu contre placebo

M. BUVAT-HERBAUT, J. BUVAT, A. LEMAIRE, G. MARCOLIN

*Association pour l'Etude de la Pathologie de l'Appareil Reproducteur et de la Psychosomatique (EPARP),
47-49 rue de la Bassée, 59000 LILLE*

BUTS

Le Moxisylyte est un alphabloqueur. Injecté dans les corps caverneux, il permet à beaucoup d'impuissants d'avoir un rapport satisfaisant et n'expose qu'à un risque minime d'érection prolongée et de priapisme. Pourtant, moins de 50% des impuissants qui ont un rapport sexuel normal après ce type d'injection intracaverneuse (IIC) présentent une érection rigide lorsque le médecin les observe lui même après injection de la même dose (Buvat et al, J. Urol 1989, 141 : 1364). Chez les autres, le Moxisylyte n'induit alors qu'une intumescence sans rigidité. On peut donc supposer qu'il facilite la réponse érectile à la stimulation sexuelle qui s'exerce dans l'intimité. Dans cette étude, nous avons essayé de démontrer cet effet facilitant en comparant les effets du Moxisylyte à ceux d'un placebo sur la réponse à deux types de stimulations sexuelles appliquées dans notre centre : une vibration, qu'on peut assimiler à la stimulation sexuelle tactile naturelle, et la stimulation sexuelle audio-visuelle (SSAV), qu'on peut assimiler à une stimulation sexuelle psychique naturelle.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Sujets : L'étude a porté sur 10 impuissants psychogènes volontaires, âgés de 29 à 52 ans.
Protocole : Chaque sujet a signé un consentement éclairé et a été testé deux fois à 7 jours d'intervalle, l'une après IIC de 10 mg de

Moxisylyte dissout dans 2 ml de sérum salé, et l'autre après IIC d'un placebo dissout dans le même volume. L'ordre des IIC fut déterminé de façon randomisée selon un protocole en double insu. Les effets de l'injection ont été observés pendant 10 mn, puis le pénis fut soumis à une vibration effectuée par un Vibrector Ling pendant 3 mn, à une fréquence variant de 30 à 50 Hertz. Puis il y eut une période d'observation sans stimulation de 7 mn, et enfin le sujet eut une SSAV de 10 mn, au moyen de films érotiques. Cinq paramètres ont été évalués aux temps 0, 10, 13, 20 et 30 mn : circonférences à la base et à l'extrémité de la hampe pénienne, longueur du pénis, pression axiale mesurée avec un rigidimètre axial, et angle d'érection.

Statistiques : La comparabilité des groupes fut vérifiée. Puis les comparaisons furent faites aux différents temps par l'intermédiaire d'une analyse de variance, et, en ce qui concerne l'évaluation de l'effet facilitant du Moxisylyte sur la réponse à la stimulation sexuelle, au moyen d'une analyse de covariance avec le logiciel Statistical Analyses System.

RÉSULTATS

Le profil de réponse fut le même pour chaque paramètre : après placebo, pas de modification jusque 20 mn, y compris pendant et après vibration, puis discrète augmentation de chaque paramètre pendant la SSAV. A l'inverse, après Moxisylyte, augmentation déjà signi-

ficative de tous les paramètres après 10 mn. Augmentation plus rapide pendant la vibration. Plateau, ou légère diminution, après arrêt de la vibration. Enfin, augmentation supplémentaire pendant la SSAV. Les valeurs moyennes de chaque paramètre furent significativement plus élevées à chaque temps avec le Moxisylyte, ($p < 0,02$ à $0,002$). L'analyse de covariance montra une augmentation significativement plus importante de chaque paramètre, sauf de la longueur du pénis, après Moxisylyte pendant la vibration ($p < 0,02$ à $0,006$). A l'inverse, et bien que la proportion d'augmentation de l'érection fut également plus importante après Moxisylyte pendant la SSAV, la différence n'atteignit pas le niveau de la signification statistique.

Conclusions :

Cette étude confirme sans équivoque l'activité du Moxisylyte sur l'érection. Elle confirme particulièrement son effet facilitant sur la

réponse à la vibration, et donc probablement la stimulation tactile, puisque la réponse à l'association vibration-Moxisylyte fut significativement plus élevée que celle au Moxisylyte seul, et à l'association Vibration-placebo. Par contre l'effet facilitant sur la réponse à la SSAV, et donc probablement sur la stimulation psychique, n'a pu être démontré. Cependant la différence aurait peut-être atteint le niveau de signification statistique si nous avions étudié plus de cas, ou si la SSAV avait été le premier, ou le seul test de stimulation. Nos résultats expliquent pourquoi une substance qui semble peu efficace devant le médecin peut l'être dans l'intimité, et confirme que des doses plus faibles que celles requises pour induire une érection complète dans un environnement médical, ou des substances moins puissantes, peuvent obtenir des résultats thérapeutiques satisfaisants tout en réduisant les risques d'érection prolongée.

Activité 5 α -réductase des cellules de prostate humaine en culture

CH. BOUDON (1), A. TERRAZA(1), M. NAVARRO(1), X. REBILLARD(2), E. LECHEVALLIER(3),
C. COULANGE(3) ET CH. SULTAN(1-4)

(1) INSERM Unité 58, Montpellier, (2) Service d'Urologie, CHU Montpellier-Nîmes, (3) Service d'Urologie, Hôpital La Timone, Marseille, (4) Unité BEDR, Hôpital Lapeyronie, Montpellier

La conversion de testostérone en dihydrotestostérone par l'enzyme 5 α -réductase est une réaction clef dans l'action des androgènes. Elle est essentielle dans le développement de tissus androgène-dépendants comme la prostate. En effet, l'activité 5 α -réductase est élevée dans les prélèvements d'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP).

Afin de comparer l'activité 5 α -réductase dans les différentes zones constitutives de la prostate normale, nous avons mis en place la culture de cellules provenant des 5 zones : - zone périphérique (ZP), zone centrale (ZC), zone transitionnelle (ZT), zone périurétrale (ZPU), stroma fibro-musculaire antérieur (SFMA).

L'activité 5 α -réductase a été évaluée par la mesure des dérivés 5 α -réduits formés [dihydrotestostérone (DHT), 5 α -3 α et 5 α -3 β androstane-diols (Diols), 5 α - Δ 5-androstène-

dione (5 α - Δ 5)] par les cellules incubées en présence de substrat [14 C]-Testostérone (200 nM) et libérés par les cellules. Les résultats figurent sur le tableau 1.

Il apparaît une variation importante de l'activité 5 α -réductase en fonction de la zone considérée. Cette activité prédomine dans la zone transitionnelle de la prostate normale. Dans les cellules épithéliales de zone transitionnelle d'HBP (tableau 2), la production des dérivés 5 α réduit est fortement augmentée (m = 133 nM/mg prot/j vs 45 nM/mg prot/j).

Ces données (préliminaires) démontrent la variabilité de l'activité 5 α -réductase en fonction de la zone considérée dans la prostate humaine normale et suggèrent une participation des cellules épithéliales à la production des dérivés 5 α -réduits au cours de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

TABLEAU 1

Zones de la prostate	ZP	ZC	ZT	ZPU	SFMA
Production totale des dérivés 5 α réduits (nM/mg prot/j)	27	40	45,6	29,4	32,1
DHT (nM/mg prot/j)	16,8	19	30,5	15,3	26,6
Diols (nM/mg prot/j)	4	4,2	9,4	9,4	2,2
5 α - Δ 5 (nM/mg prot/j)	6,2	16,8	5,7	4,7	3,3

TABLEAU 2

ADENOMES (ZT)	1	2	3	4
Nombre de boîtes	n=4	n=4	n=2	n=2
Production totale des dérivés 5 α -réduits. (nM/mg prot/j)	117,4 \pm 28,5	155 \pm 13,6	139,4 \pm 8	120,5 \pm 11
DHT (nM/mg prot/j)	71,6 \pm 8	109,6 \pm 8,8	80,4 \pm 14,8	72,5 \pm 0,7
Diols (nM/mg prot/j)	14,6 \pm 10	22,2 \pm 10	28,5 \pm 12,8	16,8 \pm 1,1
5 α - Δ 4 (nM/mg prot/j)	31,2 \pm 12	23,2 \pm 19	30,5 \pm 11,6	31,2 \pm 5,8