

L'hormone anti-müllérienne

L'hormone anti-müllérienne (AMH), sécrétée par les cellules de Sertoli du testicule fœtal, est responsable de la régression des canaux de Müller chez les fœtus mâles. La signification d'une sécrétion persistante de cette hormone par l'ovaire et le testicule adultes reste inconnue. L'isolement récent du gène et la détermination de la structure complète de l'AMH devraient permettre de compléter nos connaissances sur le contrôle de l'expression de cette hormone et sur les bases moléculaires de son activité biologique.

Nathalie Josso
Jean-Yves Picard
Bernard Vigier
Dien Tran

* GLOSSAIRE *

Épithélium cœlomique : épithélium recouvrant la cavité cœlomique, qui deviendra le péritoine.

Rete testis : partie terminale des tubes séminifères, communiquant avec la tête de l'épididyme.

Freemartin : génisse unie pendant la vie fœtale à un jumeau mâle par des anastomoses vasculaires placentaires. Les génisses freemartins sont apparemment normales, mais se révèlent stériles, car elles n'ont ni utérus ni trompes, et leurs ovaires sont atrophiés, dépourvus de cellules germinales et souvent même masculinisés. On sait maintenant que ces anomalies génitales sont liées au passage précoce de l'AMH dans la circulation du jumeau femelle.

ADRESSE

N. Josso, J.-Y. Picard, B. Vigier, D. Tran : unité de recherches sur l'endocrinologie du développement, Inserm U. 293, hôpital des Enfants-Malades, 75743, Paris cedex 15.

Les canaux de Müller — du nom de l'anatomiste allemand qui les décrit en 1930 — constituent les ébauches embryonnaires de l'appareil génital interne femelle. Chez l'embryon humain, que nous prendrons pour modèle, à l'âge de six semaines environ, une invagination de l'épithélium cœlomique* s'insinue entre la gonade et le rein primitif, ou mésonéphros. Guidée par le canal excréteur de ce dernier, le canal de Wolff, cette tête de pont progresse en direction caudale tout en se rapprochant du canal du côté opposé, jusqu'à se fusionner avec lui, peu avant d'atteindre le sinus urogénital. Chez la femelle, les canaux de Müller persistent et se différencient en trompes de Fallope, utérus et partie supérieure du vagin. Chez l'embryon mâle, au contraire, la régression des canaux de Müller est observée très précocement, dès l'âge de huit semaines, et constitue le premier signe de différenciation sexuelle de l'appareil génital.

Un concept dû à Alfred Jost

L'idée que la régression des canaux de Müller est due à l'action d'un facteur testiculaire

indépendant, différent de la testostérone, seule hormone testiculaire connue à l'époque, a été proposée par Alfred Jost, à la suite d'expériences menées chez le fœtus de lapin [1] (figure 1). Alors que l'ablation des testicules chez le jeune fœtus inhibe toute différenciation masculine, celle-ci peut être partiellement rétablie — ou induite chez le fœtus femelle — par l'implantation d'un cristal de testostérone. La testostérone maintient les canaux de Wolff, qui deviennent les canaux déférents et les vésicules séminales, développe la prostate et virilise les organes génitaux externes. Elle n'a en revanche aucun effet sur les canaux de Müller, qui se différencient comme chez une femelle normale. Une régression localisée des canaux de Müller peut cependant être obtenue en greffant un fragment de testicule fœtal en position paraovarienne.

Ces expériences conduisirent leur auteur à postuler dès 1953 l'existence d'un facteur testiculaire indépendant de la testostérone, et responsable de la régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle (figure 2). Ce concept est à l'heure actuelle complètement validé : l'hormone anti-müllérienne, AMH, une glycoprotéine dimérique, aux sous-unités reliées

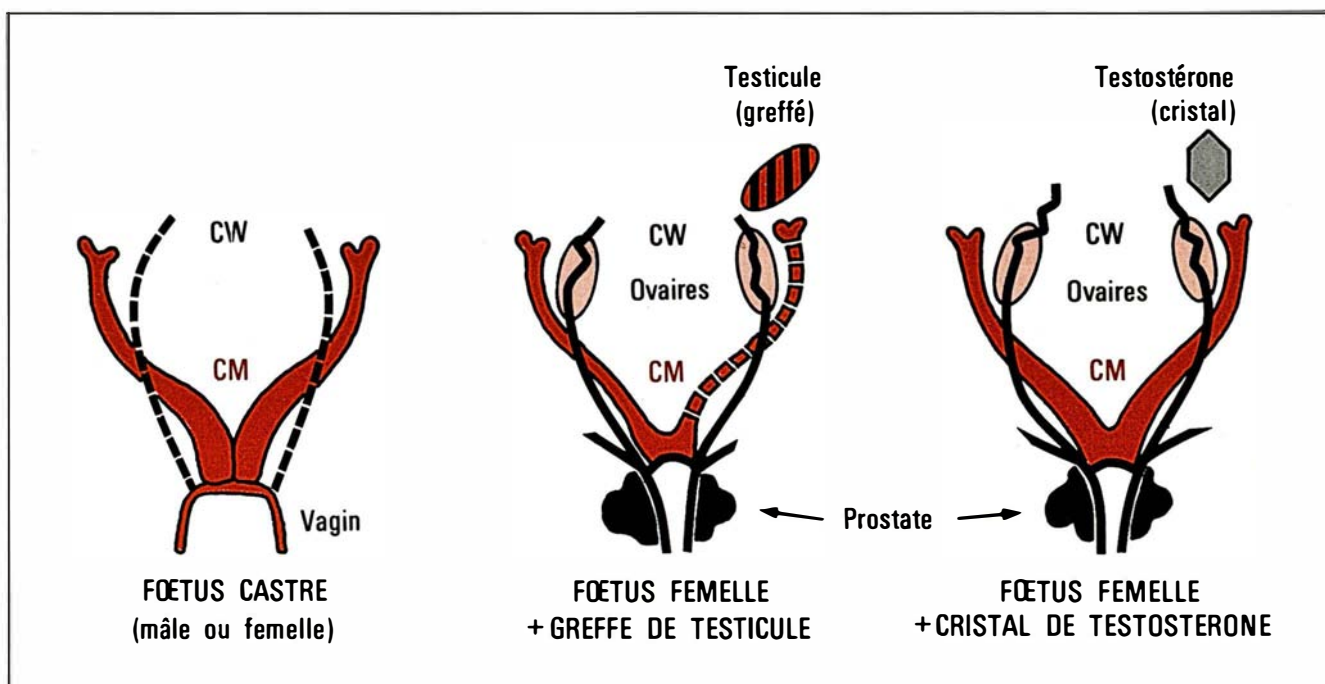


Figure 1. **Effet de diverses manipulations hormonales sur la différenciation sexuelle du fœtus.** CM = canaux de Müller ; CW = canaux de Wolff. A gauche, la castration aboutit à une différenciation sexuelle femelle (maintien des canaux de Müller, régression des canaux de Wolff) quel que soit le sexe génétique du fœtus opéré. Au centre, la greffe d'un fragment testiculaire rétablit la différenciation mâle (régression des canaux de Müller, maintien des canaux de Wolff) du côté greffé. A droite, l'implantation d'un cristal de testostérone provoque une différenciation mâle partielle, limitée au maintien des canaux de Wolff : le développement des canaux de Müller n'est pas affecté.

par des ponts disulfure, est purifiée depuis 1984 [2], et l'ADN complémentaire du messager de cette hormone [3, 4], puis le gène lui-même [3], ont été clonés. Le gène a été localisé à l'extrémité du bras court du chromosome 19 [5].

Comment étudier l'AMH ?

Les progrès enregistrés dans l'étude de l'AMH sont à mettre au crédit du développement de nouvelles techniques. Initialement, c'est la mise au point d'un test biologique de l'activité anti-müllérienne qui a permis de débloquent la situation relativement stagnante dans ce domaine de recherche. Régine Picon [6], travaillant alors dans le laboratoire d'A. Jost, à la faculté des sciences, montra que la régression des canaux de Müller peut être obtenue in vitro en utilisant comme organe-cible un tractus génital de fœtus de rat sexuellement indiffé-

rencié et privé de ses gonades au moment de la mise en culture. La source de l'AMH peut être soit un fragment de testicule provenant d'un fœtus de mammifère ou d'oiseau et cultivé en contact avec le tractus génital, soit de l'AMH ajoutée au milieu de culture. Au bout de trois jours de culture, l'étude histologique du tractus génital permet d'apprécier le degré de régression du canal de Müller. La régression complète est caractérisée par la disparition de l'épithélium müllérien, remplacé par un anneau dense de fibroblastes. L'étude ultrastructurale a permis de souligner l'importance des modifications du mésenchyme qui accompagnent la régression müllérienne [7]. Il est possible — mais non encore prouvé — que les récepteurs müllériens de l'AMH se trouvent en fait non sur les cellules épithéliales elles-mêmes, mais sur le mésenchyme avoisinant. Pour l'instant, toute-

fois, les récepteurs de l'AMH n'ont pas été localisés.

Le test biologique a rendu des services considérables, permettant en particulier de montrer la nature macromoléculaire de l'AMH et d'en localiser l'origine cellulaire. Toutefois, ce test est relativement peu sensible (600-1 200 ng/ml), long à exécuter, et surtout il n'est pas quantitatif. C'est pourquoi on lui préfère, chaque fois que possible, le dosage radio-immunologique, disponible depuis 1982, mais uniquement chez les ruminants. On dispose actuellement de deux types de dosage radio-immunologique de l'AMH. Le premier [8, 9] utilise des anticorps monoclonaux, dont l'un sert à recouvrir des billes de polystyrène qui sont mises au contact de l'échantillon à doser. L'autre anticorps, marqué par l'iode radioactif, se fixe sur l'AMH liée aux billes. L'intérêt de cette méthode réside dans le

fait que sa mise en œuvre ne nécessite pas la purification préalable de l'hormone à doser. On peut, pour construire la courbe d'étalonnage, faire appel à un milieu biologique dont la concentration en AMH est prédéfinie — c'est la solution choisie par Bernard Vigier et ses collaborateurs à Paris [8] — ou à une prépara-

tion d'AMH partiellement purifiée — c'est ce que fait l'équipe de Patricia Donahoe à Boston [9]. De meilleurs résultats sont cependant obtenus par une technique de compétition, qui consiste à faire déplacer, par l'AMH de l'échantillon, de l'AMH purifiée marquée par l'iode radioactif fixée sur un anticorps polyclonal. Par cette

méthode, on peut détecter moins de 0,3 nanogrammes d'AMH bovine [10]. L'AMH de mouton et celle de chèvre sont également reconnues, mais ce dosage n'est pas applicable à d'autres espèces de mammifères.

Une superfamille de protéines dimériques

L'AMH est purifiée à partir d'un milieu d'incubation de testicule de fœtus de veau. Les protéines présentes dans le milieu d'incubation sont précipitées par le sulfate d'ammonium, soumises à une chromatographie d'échange d'anions, et l'AMH est isolée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'anticorps monoclonal [2] (figure 3, ci-contre).

C'est une protéine dimérique, d'un poids moléculaire de 145 000, qui est sans doute produite d'abord sous forme d'une préhormone, dont un peptide signal hydrophobe de 16 à 17 acides aminés [3] est clivé au moment du passage de la molécule à travers la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. Les sous-unités sont reliées par des ponts disulfure. Ce caractère l'apparente à la sous-unité β de l'inhibine porcine [11] et au *transforming growth factor* β (TGF β , voir nouvelle m/s n° 8, vol. 2, p. 467) [12], avec lesquels elle partage une homologie d'environ 20 % — au niveau de la partie polypeptidique carboxyterminale, ainsi que l'ont récemment montré Cate et ses collaborateurs de la Société Biogen [3] (figure 4). Ces homologies sont particulièrement marquées au niveau des résidus cystéine — l'AMH en contient 12, l'inhibine et le TGF β chacun neuf. Les gènes codant pour ces trois protéines sont riches en séquences GC (acide guanylique, acide cytidylique).

Sur le plan physiologique, les similitudes entre les trois protéines sont moins évidentes. Il existe deux formes d'inhibine, A et B, chacune formée d'une sous-unité α de 18 000 daltons, identique pour les formes A et B, et d'une sous-unité β de 14 000 daltons

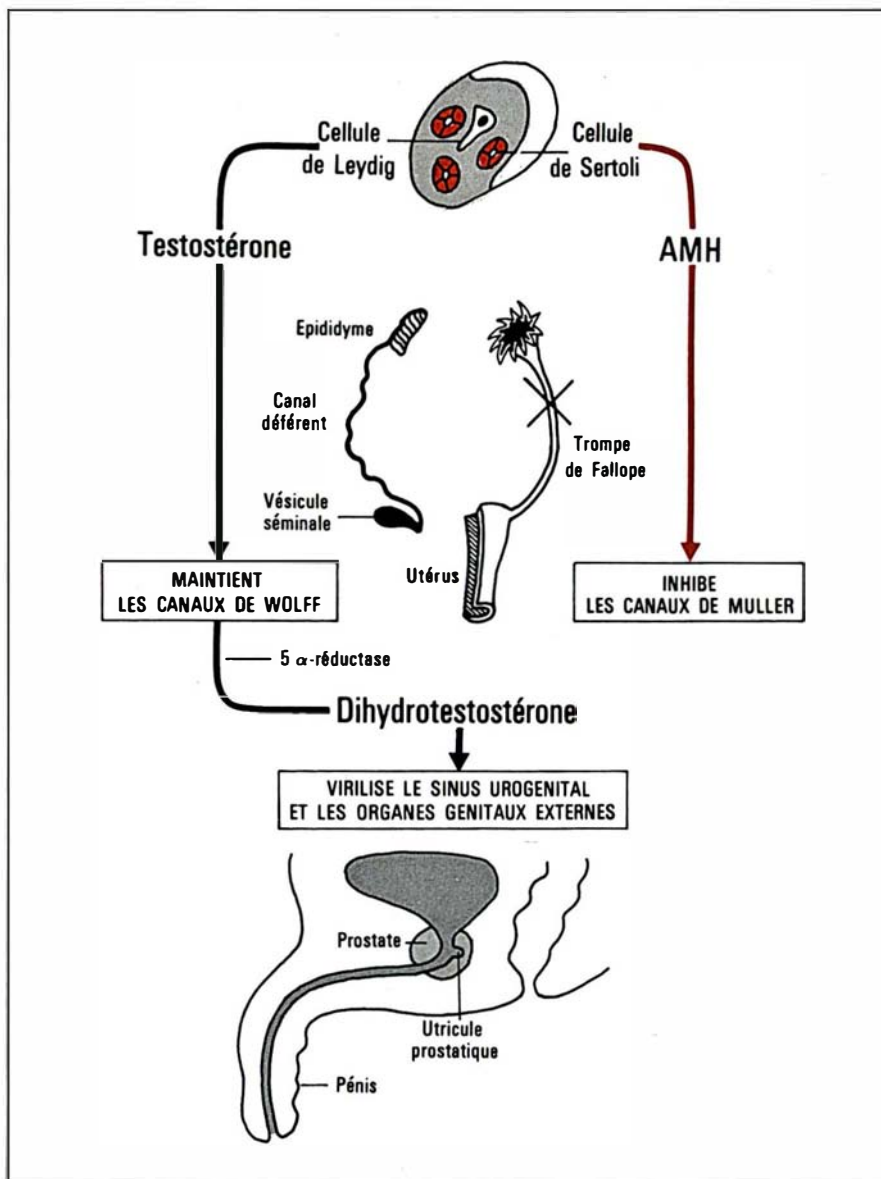


Figure 2. **Schéma de la différenciation sexuelle mâle.** La testostérone, produite par les cellules de Leydig, maintient les canaux de Wolff et virilise le sinus urogénital et les organes génitaux externes. L'hormone anti-müllérienne inhibe le développement des canaux de Müller.

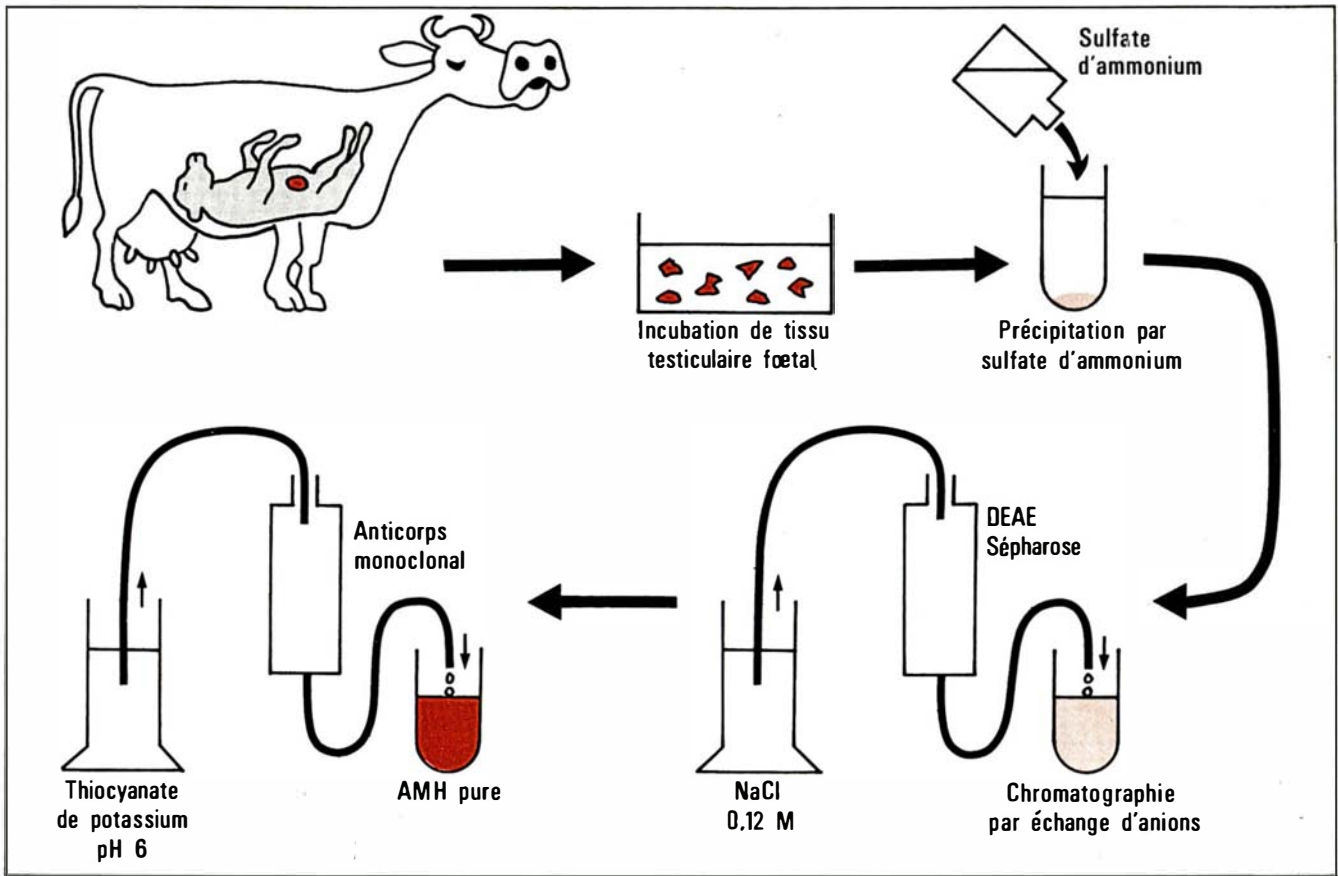


Figure 3. **Purification de l'AMH bovine.** L'AMH présente dans le milieu d'incubation de tissu testiculaire fœtal bovin est précipitée par le sulfate d'ammonium, chromatographiée par échange d'anions, puis retenue sur une colonne d'anticorps monoclonal dont elle est éluée par le thiocyanate de potassium.

dont les formes A et B diffèrent légèrement (voir nouvelle m/s n° 2, vol. 2, p. 466) [11]. Ce produit des cellules de la granulosa et des cellules de Sertoli adultes inhibe la sécrétion de follicle stimulating hormone (FSH) par l'hypophyse. Puisque la FSH stimule l'activité fonctionnelle des cellules somatiques de la gonade, l'inhibine joue le rôle d'agent de rétrocontrôle. L'autre protéine avec laquelle l'AMH partage une homologie partielle est le TGFβ. Ce facteur de croissance, formé de deux chaînes identiques, d'un poids moléculaire de 25 000 daltons, est sécrété par les cellules transformées par le virus du sarcome murin de Moloney, mais peut être également isolé à partir de cellules non néoplasiques, comme les plaquettes sanguines. A

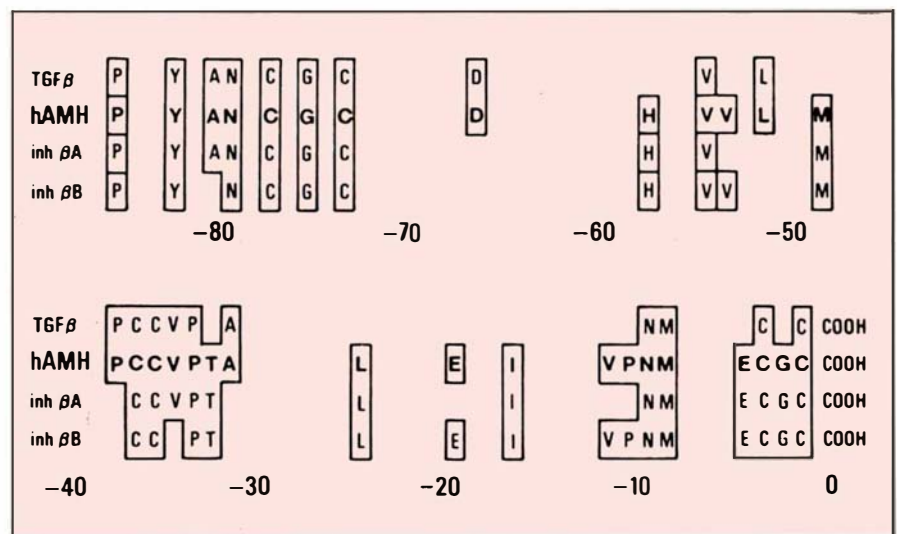


Figure 4. **Homologie partielle de structure** entre l'hormone anti-müllérienne humaine (hAMH), la sous-unité β de l'inhibine porcine (inh βA et inh βB) et le transforming growth factor β (TGFβ). (Tiré de [3]).

RÉFÉRENCES

1. Jost A. Problems of fetal endocrinology : the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 1953 ; 8 : 379-418.
2. Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984 ; 34 : 23-9.
3. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, et al. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986 ; 45 : 685-98.
4. Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 5464-8.
5. Cohen-Haguenaer O, Picard JY, Mattei MG, et al. Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 1987 ; 44 : 2-6.
6. Picon R. Action du testicule fœtal sur le développement in vitro des canaux de Müller chez le rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1969 ; 58 : 1-19.
7. Trelstad RL, Hayashi A, Hayashi K, Donahoe PK. The epithelial mesenchymal interface of the male rat Müllerian duct : loss of basement membrane integrity and ductal regression. *Dev Biol* 1982 ; 92 : 27-40.
8. Vigier B, Legeai L, Picard JY, Josso N. A sensitive radioimmunoassay for bovine anti-müllerian hormone, allowing its detection in male and freemartin fetal serum. *Endocrinology* 1982 ; 111 : 1409-11.
9. Necklows EC, LaQuaglia MP, MacLaughlin D, Hudson P, Mudgett-Hunter M, Donahoe PK. Detection of Müllerian inhibiting substance in biological samples by a solid phase sandwich radioimmunoassay. *Endocrinology* 1986 ; 118 : 791-6.
10. Vigier B, Picard JY, Campargue J, Forest MG, Heyman Y, Josso N. Secretion of anti-müllerian hormone by immature bovine Sertoli cells in primary culture, studied by a competition type radio-immunoassay : lack of modulation by either FSH or testosterone. *Mol Cell Endocrinol* 1985 ; 43 : 141-50.
11. Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, et al. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor. *Nature* 1985 ; 318 : 659-63.
12. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor : a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 119-23.

l'inverse de l'inhibine, il potentialise la sécrétion d'estrogènes par l'ovaire stimulé par la FSH [13]. Le TGF β exerce des actions complexes sur la croissance cellulaire, tendant à inhiber la croissance des lignées épithéliales et à stimuler au contraire celle des lignées d'origine mésenchymateuse [14]. Toutefois, il ne possède pas d'action spécifique anti-müllérienne, de même que l'AMH n'entre pas en compétition avec le TGF β pour la liaison avec des cellules cortico-surréaliennes (Cochet, communication personnelle). Les gènes codant pour l'AMH et pour le TGF β sont tous deux situés sur le chromosome 19, le premier à l'extrémité du bras court [5] et le

second à l'extrémité du bras long [15]. Celui de l'inhibine n'a pas encore été localisé. Le gène de l'AMH est un gène unique, comportant au total 2,8 kilobases, réparties en cinq exons. Cate et ses collaborateurs [3] ont déterminé la séquence du gène bovin et du gène humain, qui sont homologues à 78 %, surtout au niveau de l'extrémité 3' du gène. Les bases codant pour les 12 cystéines de la protéine sont toutes conservées. Le promoteur du gène de l'AMH bovine est particulièrement riche en séquences GC, ce qui est une caractéristique fréquente des gènes eucaryotiques, notamment de ceux à expression ubiquitaire (... ce qui n'est pas le

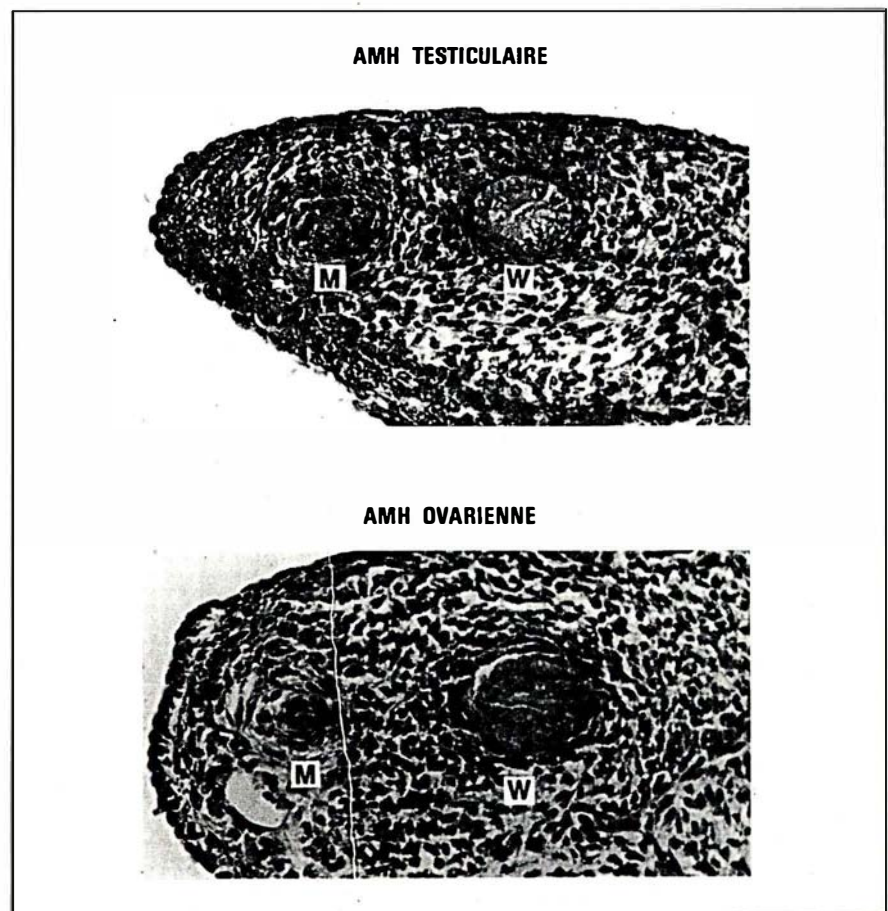


Figure 5. **Régression du canal de Müller de fœtus de rat, exposé en culture organotypique à une concentration de 750 ng/ml d'AMH.** Haut : AMH d'origine testiculaire purifiée à partir de milieu d'incubation de tissu testiculaire de fœtus de veau. Bas : AMH d'origine ovarienne purifiée à partir de liquide folliculaire d'ovaire de vache adulte.

cas du gène de l'AMH !). La détermination de la séquence nucléotidique des régions flanquantes 5' du gène humain est en cours dans notre laboratoire.

Une hormone sucrée

Comme beaucoup de protéines destinées à l'exportation extracellulaire, l'AMH contient, associée à sa cupule polypeptidique, une partie glucidique qui représente 13,5 % du poids de la molécule. La nature glycoprotéique de l'hormone a été soupçonnée dès 1978 [16] en raison de la discordance entre les valeurs de poids moléculaire obtenues par deux méthodes différentes, la filtration sur gel et la sédimentation en gradient de saccharose. Cette hypothèse était appuyée par la

constatation que le fucose radioactif, ajouté au milieu dans lequel incubent des fragments de testicule fœtal, se comporte comme un marqueur biochimique de l'activité biologique anti-müllérienne. C'est incidemment, grâce à ce marqueur, qu'ont pu être sélectionnés les hybridomes spécifiques de l'AMH obtenus par immunisation avec de l'AMH impure [17], hybridomes qui ont permis par la suite la purification de l'hormone [2]. En tant que glycoprotéine, l'AMH contracte des liaisons avec certaines protéines d'origine habituellement végétale, les lectines, qui ont une affinité spécifique envers certains groupes d'oligosaccharides. C'est ainsi que l'AMH se lie à la lectine de germe de blé [18, 19], à la canavoline A [19] et à l'une des

sous-unités de la phytohémagglutinine [18].

L'analyse des sucres contenus dans l'AMH pure [20] suggère que celle-ci comporte un mélange d'oligosaccharides N- et O-glycosidiques. Les premiers, liés en général à l'asparagine par l'intermédiaire d'une molécule de N-acétylglucosamine, caractérisent les protéines sécrétées. La molécule d'AMH contient deux asparagines susceptibles de servir de point d'ancrage à ce type d'oligosaccharides [3]. Toutefois, l'AMH contient probablement aussi des oligosaccharides liés par une liaison O-glycosidique entre la galactosamine d'une part et la sérine ou la thréonine d'autre part, structure fréquemment retrouvée dans les glycoprotéines des sécrétions épithéliales. Cela n'a rien

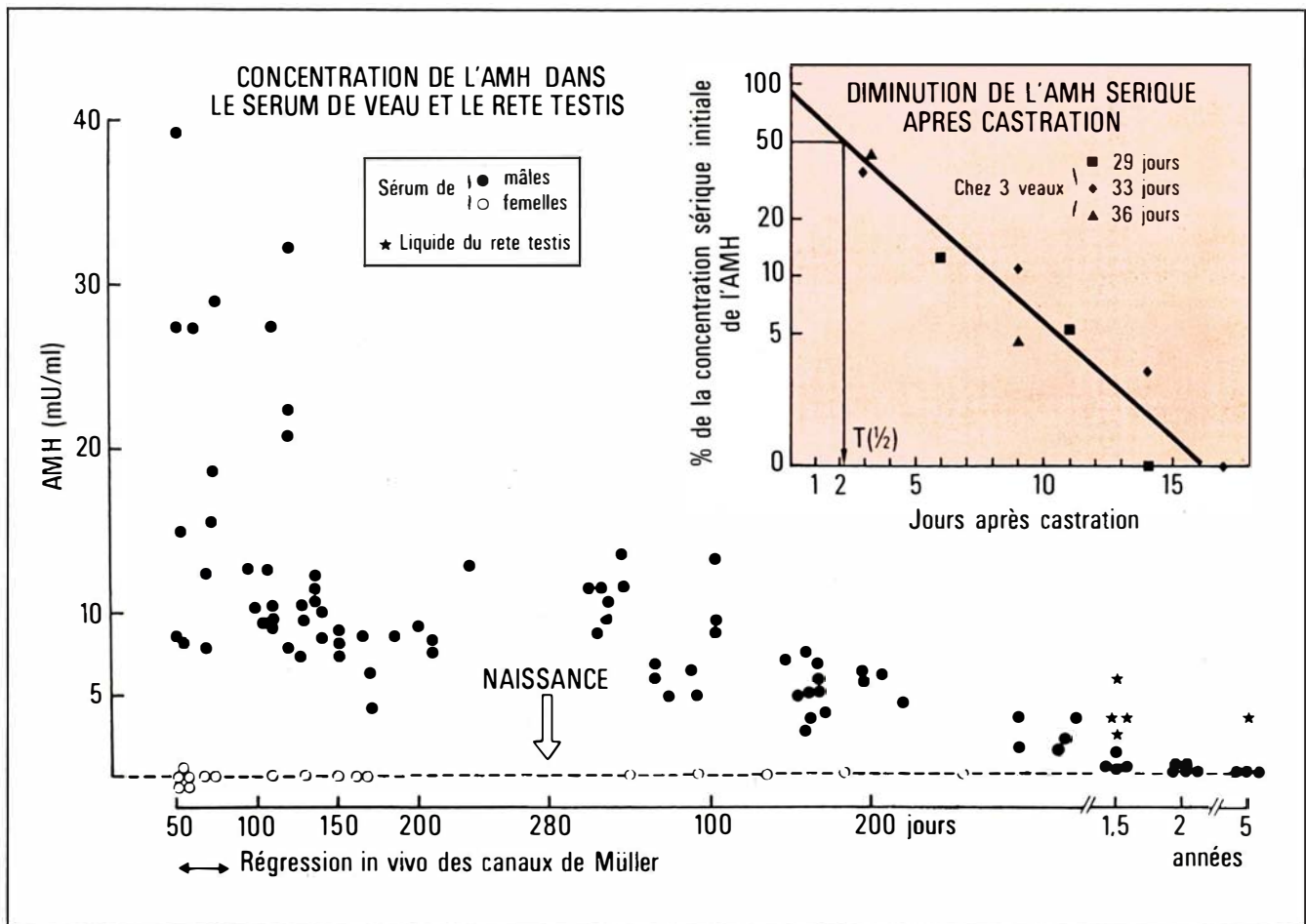


Figure 6. **Ontogenèse de l'AMH chez le veau.** mU = milli-unité.

RÉFÉRENCES

13. Ying SY, Becker A, Ling N, Ueno N, Guillemin R. Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF β) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 ; 136 : 969-75.
14. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 4167-71.
15. Fujii DM, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somatic Cell Genet* 1986 ; 12 : 281-8.
16. Picard JY, Tran D, Josso N. Biosynthesis of labelled anti-müllerian hormone by fetal testes : evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. *Mol Cell Endocrinol* 1978 ; 12 : 17-30.
17. Vigier B, Picard JY, Josso N. A monoclonal antibody against bovine anti-müllerian hormone. *Endocrinology* 1982 ; 110 : 131-7.
18. Picard JY, Josso N. Hormone anti-müllérienne et lectines : nouvelles perspectives. *Ann Endocrinol (Paris)* 1980 ; 41 : 538-44.
19. Budzik GP, Swann DA, Hayashi A, Donahoe PK. Enhanced purification of Müllerian inhibiting substance by lectin affinity chromatography. *Cell* 1980 ; 21 : 909-15.
20. Picard JY, Goulut C, Bourrillon R, Josso N. Biochemical analysis of bovine testicular anti-Müllerian hormone. *FEBS Lett* 1986 ; 195 : 73-6.
21. Tran D, Josso N. Localization of anti-müllerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine Sertoli cell using immunocytochemistry with a monoclonal antibody. *Endocrinology* 1982 ; 111 : 1562-7.
22. Hayashi H, Shima H, Hayashi K, Trelstad RL, Donahoe PK. Immunocytochemical localization of Müllerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1984 ; 32 : 649-54.
23. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti müllerian hormone : another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984 ; 114 : 1315-20.
- d'étonnant puisque, justement, l'AMH est produite par des cellules gonadiques d'origine épithéliale, les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa.

L'AMH, hormone unisexe

Le principal site de production de l'AMH est le testicule et plus particulièrement les cellules de Sertoli, qui sont les cellules somatiques entourant les cellules spermatogénétiques dans le tube séminifère. L'AMH ne représente pas une proportion importante des protéines sécrétées par les cellules de Sertoli. L'ARN messager spécifique de l'hormone ne représente que 0,01 à 0,05 % des ARN messagers totaux isolés à partir du testicule fœtal. Dans la cellule de Sertoli, l'AMH est stockée essentiellement dans le réticulum endoplasmique rugueux [21, 22]. La quantité de cet organite au niveau de la cellule de Sertoli diffère beaucoup en fonction de l'espèce : très abondante chez le veau et les autres jeunes ruminants, elle l'est beaucoup moins chez l'homme, et encore moins chez le rat. La possibilité pour la cellule de Sertoli des ruminants de stocker une grande quantité d'AMH explique peut-être en partie pourquoi le phénomène du freemartinisme* est observé presque uniquement dans ces espèces : nous y reviendrons.

L'AMH est également produite par les cellules ovariennes homologues des cellules de Sertoli, les cellules de la granulosa, qui entourent l'ovocyte au niveau du follicule [23]. La quantité produite par les cellules de la granulosa est environ mille fois plus faible que celle synthétisée par les cellules de Sertoli mais, à dose égale, l'activité biologique de l'AMH testiculaire ou ovarienne est tout à fait comparable (figure 5, p. 448).

L'ontogenèse de l'AMH

L'AMH testiculaire est produite essentiellement par la cellule de Sertoli immature. Décelable dès le début de l'organogenèse testiculaire, sa production culmine au

moment où les canaux de Müller régressent chez le fœtus mâle [24], puis diminue, restant en palier jusqu'au tout début de la période pubertaire (figure 6, page précédente). La maturation pubertaire de la cellule de Sertoli s'accompagne d'une baisse significative de sa production d'AMH ; cependant, l'hormone est toujours décelable chez l'adulte, dans le liquide du *rete testis** [24].

En revanche, l'AMH ovarienne est produite surtout par la cellule de la granulosa adulte. L'ontogenèse de l'AMH ovarienne a été étudiée par immunocytochimie chez la vache [25] et chez la brebis [26]. Absente de l'ovaire du fœtus, on la trouve déjà au moment de la naissance et chez l'animal prépubertaire, mais uniquement dans les cellules de la granulosa qui peuplent les follicules en croissance et les follicules cavitaires, les follicules primordiaux n'en contenant jamais. Chez l'adulte, la réaction est plus intense, mais la répartition en fonction de la maturation folliculaire est la même.

Une privilégiée : l'AMH des ruminants

Les expériences relatées jusqu'ici ont été effectuées essentiellement chez le veau. Celui-ci n'a pas la réputation d'être un animal de laboratoire particulièrement accessible pourtant, si l'on a jusqu'ici préféré l'utiliser, c'est uniquement pour des raisons pratiques, dans la mesure où l'abattage de vaches gestantes permet l'obtention en quantité relativement importante de tissu testiculaire fœtal, matériel de départ pour la purification. L'AMH bovine purifiée a été utilisée pour la production d'anticorps mono- et polyclonaux. Or, il se trouve que la plupart des anticorps monoclonaux sont étroitement zoospécifiques, ne reconnaissant que l'AMH bovine, ovine et caprine [27]. Les anticorps polyclonaux sont un peu moins sélectifs, mais leur affinité pour l'AMH bovine est bien supérieure à celle qu'ils manifestent pour l'AMH d'autres espèces.

* Voir glossaire p. 444.

Certains anticorps monoclonaux réagissent pourtant avec l'AMH d'espèces non bovines. Les premiers ont été obtenus par immunisation contre l'AMH bovine [27], ils reconnaissent donc des épitopes communs entre celle-ci et celle d'autres espèces telles que le lapin, le porc, le chat. Plus récemment, des tentatives ont été faites pour obtenir des anticorps monoclonaux par immunisation avec de l'AMH non bovine, purifiée à partir d'homogénats d'une petite quantité de tissu par immunochromatographie sur des immunoglobulines polyclonales anti-AMH bovine, immunopurifiées. Ces tentatives pour obtenir des anticorps monoclonaux anti-AMH humaine, ou anti-AMH de rat, ont donné des résultats préliminaires positifs ; toutefois, tous les anticorps reconnaissant l'AMH autre que bovine sont des immu-

noglobulines M peu stables, ce qui restreint beaucoup leur utilité. Jusqu'à présent, ces anticorps n'ont pu être employés qu'en immunocytochimie.

A quoi sert l'AMH ?

Comme son nom l'indique, l'AMH est impliquée dans la régression des canaux de Müller chez le fœtus mâle, mais également chez le fœtus femelle, lorsque celui-ci se trouve mis précocement en contact avec l'hormone. Cette éventualité est réalisée dans l'espèce bovine au cours du freemartinisme, lorsqu'une vache est porteuse d'une grossesse gémellaire hétérosexuelle (figure 7). Du fait des anastomoses nombreuses et précoces qui unissent les placentas des deux jumeaux, le taux d'AMH circulante est identique dans les circulations des deux

fœtus [28], ce qui explique que les canaux de Müller régressent en même temps chez le mâle et chez la femelle freemartin. Nous avons vu que l'AMH est aussi présente dans l'ovaire normal, mais elle y apparaît tardivement, après que les canaux de Müller aient cessé d'être sensibles à son action ; c'est la raison pour laquelle l'AMH ovarienne n'a pas d'effet délétère sur le développement des organes génitaux internes femelles.

L'étude du freemartinisme a permis de mettre en évidence un autre effet de l'AMH. Celle-ci ne se contente pas de faire disparaître l'utérus et les trompes du jumeau freemartin, elle s'attaque également à l'ovaire lui-même, dont elle décime la population germinale et dont elle masculinise l'architecture, y faisant apparaître des structures ressemblant à des tubes séminifères et capables de

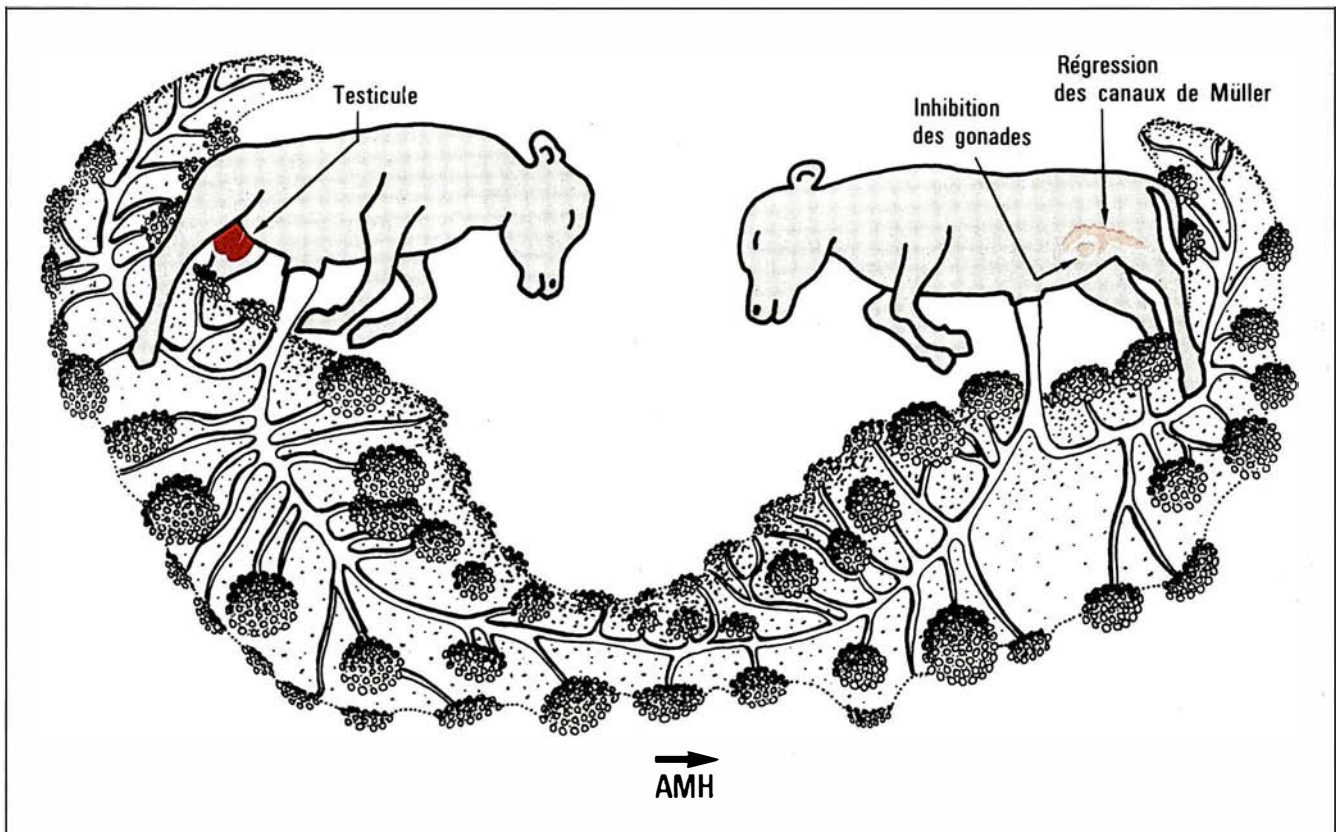


Figure 7. **Les lésions génitales du freemartinisme.** Lorsque deux jumeaux de sexe opposé sont reliés par des anastomoses placentaires, l'AMH passe dans la circulation de la femelle et provoque une atrophie ovarienne, suivie éventuellement d'une masculinisation de la gonade et d'une régression des canaux de Müller. Les lésions ovariennes peuvent être reproduites *in vitro* en faisant agir de l'AMH purifiée sur des ovaires de fœtus de rat en culture organotypique.

RÉFÉRENCES

24. Vigier B, Tran D, Du Mesnil du Buisson F, Heyman Y, Josso N. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-müllerian hormone. *J Reprod Fertil* 1983 ; 69 : 207-14.
25. Takahashi M, Hayashi M, Manganaro TF, Donahoe PK. The ontogeny of Müllerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 1986 ; 35 : 447-54.
26. Bézard J, Vigier B, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil* 1987 ; 80 : 509-16.
27. Legeai L, Vigier B, Tran D, Picard JY, Josso N. Monoclonal antibodies raised against bovine anti-müllerian hormone : bovine, ovine and caprine hormone share a set of identical epitopes. *Biol Reprod* 1986 ; 35 : 1217-26.
28. Vigier B, Tran D, Legeai L, Bézard J, Josso N. Origin of anti-müllerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J Reprod Fertil* 1984 ; 70 : 473-9.
29. Vigier B, Watrin F, Magre S, Tran D, Josso N. Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* 1987 ; 100 : 43-55.
30. Fuller AF, Krane IM, Budzik GP, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance reduction of colony growth of human gynecologic cancers in a stem cell assay. *Gynecol Oncol* 1985 ; 22 : 135-48.
31. Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Mol Cell Endocrinol* 1986 ; 47 : 225-34.
32. Coughlin JP, Donahoe PK, Budzik GP, MacLaughlin DT. Müllerian inhibiting substance blocks autophosphorylation of the EGF receptor by inhibiting tyrosine kinase. *Mol Cell Endocrinol* 1986 ; 49 : 75-86.
33. Budzik GP, Powell SM, Kamagata S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance fractionation by dye affinity chromatography. *Cell* 1983 ; 34 : 307-14.
34. Rosenwaks Z, Liu HC, Picard JY, Josso N. Anti-müllerian hormone is not cytotoxic to human endometrial cancer in tissue culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 ; 59 : 166-9.

produire de l'AMH à leur tour [28]. Le rôle de l'AMH dans la genèse des modifications ovariennes observées au cours du freemartinisme a été démontré récemment par Vigier *et al.* [29]. Ces auteurs ont exposé des ovaires de fœtus de rat à de l'AMH purifiée et y ont observé une inhibition de la prolifération des ovocytes, ainsi que la différenciation d'un type cellulaire nouveau proche des cellules de Sertoli. La sensibilité de l'ovaire fœtal à l'AMH est limitée dans le temps, ce qui explique pourquoi l'apparition tardive d'une production d'AMH par les cellules de la granulosa ne perturbe pas l'organogenèse de l'ovaire normal. Récemment, l'équipe de Patricia Donahoe, à Boston, a proposé d'autres rôles pour l'AMH, qu'elle appelle *müllerian inhibiting substance* ou MIS. Pour ces auteurs, l'AMH serait capable de s'opposer à la croissance de lignées cancéreuses issues de l'appareil génital féminin, en particulier d'une lignée de cancer ovarien et d'une lignée de cancer endométrial [30]. Elle serait également douée d'un pouvoir inhibiteur sur la méiose des ovocytes matures [31]. Enfin, elle inhiberait l'autophosphorylation du récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGF) [32]. Effectivement, ces effets divers ont bien été observés, mais avec une AMH incomplètement purifiée [33]. Il est donc possible qu'une ou plusieurs protéines contaminantes soient responsables de ces effets extra-müllériens. L'incapacité de l'AMH purifiée à affecter la croissance d'une lignée cellulaire issue d'un cancer endométrial humain [34] ou de retarder la méiose d'ovocytes de rat (Tsafirri *et al.*, communication personnelle) rend cette hypothèse plausible. La firme Biogen, qui affirmait en juin 86 avoir cloné une hormone potentiellement anti-cancéreuse [3], n'a pas vu ses espoirs confirmés par la démonstration d'un effet anti-cancéreux de l'hormone recombinante. Après avoir isolé l'AMH, faudra-t-il s'intéresser à ses compagnons de route ? ■

Summary

Anti-müllerian hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein responsible for the regression of Müllerian ducts in the male fetus. It is produced by immature Sertoli cells, and also by adult granulosa ovarian cells, but the physiological role of ovarian AMH has not been elucidated. The gene coding for bovine and for human AMH has been cloned, and shown to exhibit homology to those coding for the beta subunit of porcine inhibin, and for human transforming growth factor beta, which are also dimeric proteins. All the base pairs coding for cysteine residues are conserved between the three proteins, and also between bovine and human AMH. Bovine AMH, however, differs from that of other mammals by the possession of zoospecific, highly immunogenic epitopes, which are responsible for the fact that monoclonal immunochemical reagents, prepared against bovine AMH, do not usually recognize AMH of other species. Up to now, the only physiological roles definitely assigned to AMH are the regression of male Müllerian ducts, and the destruction of germ cells of developing fetal ovaries. Other effects, such as cytotoxicity against cancer of the female reproductive tract, and the retardation of oocyte meiotic maturation, have been demonstrated with partially purified AMH preparations, but not with the pure hormone. These effects may be due to contaminants, and deserve further study.

TIRÉS A PART

N. Josso : unité de recherches sur l'endocrinologie du développement, Inserm U. 293, hôpital des Enfants-Malades, 75743, Paris cedex 15.