



HAL
open science

Apport de la reconstruction du mésonéphros segmenté dans l'étude des connexions uro-génitales chez l'homme et la souris

Marie-Danielle Vazquez

► **To cite this version:**

Marie-Danielle Vazquez. Apport de la reconstruction du mésonéphros segmenté dans l'étude des connexions uro-génitales chez l'homme et la souris. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1999. Français. NNT : 1999NAN19903 . tel-01747590

HAL Id: tel-01747590

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747590>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I FACULTÉ DE MÉDECINE
THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I

École Doctorale de Biologie et Santé
Spécialité : Génie Biologique et Médical



APPORT DE LA RECONSTRUCTION DU MÉSONÉPHROS SEGMENTÉ
DANS L'ÉTUDE DES CONNEXIONS URO-GÉNITALES
CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 4 mai 1999

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I

Par

Marie-Danielle VAZQUEZ

Président du Jury : Professeur GÉRARD, Université de

Directeur de thèse : Professeur LEHEUP, Université de Nancy I.

Rapporteurs : Professeur JOUK, Université de Grenoble,
Professeur FABRE, Université de Strasbourg,

Examineurs : Professeur MALLET, INPL de Vandœuvre-lès-Nancy,
Docteur MAGRE, Université Paris VI,
Docteur BOUCHET, Université de Nancy I.



REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le cadre du Département de Cytologie, Embryologie et Histologie de la Faculté de Médecine de Nancy, sous la direction de Monsieur le Professeur Bruno LEHEUP. Qu'il trouve dans ce travail le témoignage de ma profonde reconnaissance pour m'avoir initié à la recherche et guidé dans ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Georges GRIGNON pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Monsieur le Professeur Pierre-Simon JOUK,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Michel FABRE,

Vous m'avez fait l'honneur de juger ce travail. Soyez en remercié.

C'est avec beaucoup de gentillesse Monsieur le Professeur Hubert GÉRARD que vous avez accepté de juger ce travail. Je vous en remercie.

Ce travail doit beaucoup à Monsieur le Professeur Jean-Laurent MALLET, Directeur du programme gOcad au sein de l'École Nationale Supérieure de Géologie. Je suis heureuse de pouvoir lui témoigner ici toute ma reconnaissance pour la générosité avec laquelle il m'a donné accès à gOcad.

C'est Madame le Docteur Solange MAGRE, Directeur du Laboratoire de Physiologie de la Reproduction de Paris VI, CNRS / ESA 700, qui a guidé mes premiers pas dans la technique de sexage des embryons. J'ai bénéficié de discussions fructifiantes et c'est donc une joie pour moi de la voir siéger parmi les membres de ce jury.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Docteur Pierre BOUCHET. Ses encouragements et ses conseils m'ont été précieux au cours de ce long travail. Il fut un pédagogue remarquable, a toujours manifesté beaucoup de compréhension et a su éveiller en moi l'intérêt de l'informatique.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Alain QUÉRÉ et à Monsieur Michel COSNARD de m'avoir accueillie et permis d'utiliser les moyens informatiques du Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications.

J'adresse tous mes remerciements à

Toutes les personnes du Département de Cytologie, Histologie et Embryologie et du Laboratoire de Microscopie Electronique, en particulier Bernadette CUNIN, Hervé MEMBRE, Denise MALAPRADE, Luc MARCHAL, Jacqueline CHANEL et Monique SIMONETTI.

Toutes les personnes du Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications, en particulier Thierry GARTISER, Laurent PIERRON, Vireack UL, Laurent ALONSO, Anne BONNEAU et Sylvain PETITJEAN.

Monsieur le Docteur Serge CORBEL et à Frédéric GIMENEZ, du Département de Chimie-Physique des Réactions et du Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie, pour la réalisation des modèles plastiques par stéréophotolithographie 3D.

Madame le Docteur Laurence VIRY et à Rosemary TITTENSOR, du Centre Interuniversitaires de Ressources Informatiques de Lorraine, pour leur aide précieuse dans le choix judicieux des tests statistiques.

Toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu dans cet effort, je tiens à adresser mes remerciements à :

Monsieur le Professeur Christian DOURNON, dont le cours sur le chromosome Y m'avait fortement intéressé,

Monsieur le Professeur Bernard FOLIGUET pour l'utilisation de la station BIOCOM,

Reyna et Humberto GONZALES, Justin AKAZAN, Luis VEGA, Thomas LAMBOLAIS, Hala et Dania NAJA, Denis ROEGEL, Najib EL CADI, Daniel BRIAUD, Slimane MERZOUK et Frodo, Lamia DJERID, Jean-Charles LAMIREL,

Laurent ANDREY, Catherine PILIÈRE, Raphaël COUTURIER, Hala et Pascal MOLLI
et Mustapha OUKDA pour leur aide.

Bernadette, Monique, Cathy, Marie-Noëlle, Sylvie et Serge, Jean-Michel et Patrick,
Petit Louis et Élodie.

Hutch, Morot,...Forbach, Elendil, Maia, Elrond, Marquette....Vomecourt,
Gerbecourt,...

Georgette, Albertine, Léontine....

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
INTRODUCTION	16
1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
1.1. LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'APPAREIL GÉNITAL	25
1.1.1. LE DÉVELOPPEMENT DES GLANDES GÉNITALES	26
1.1.2. LES CELLULES GERMINALES	28
1.1.3. LES CONNEXIONS URO-GÉNITALES	31
1.1.4. LES CONDUITS GÉNITAUX	32
1.1.5. LE DEVENIR DU MÉSONÉPHROS ET DES VOIES GÉNITALES	36
1.2. LE MÉCANISME MOLÉCULAIRE DU DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION GONADIQUE	37
1.2.1. LE RÔLE DE SRY / SRY DANS LE DÉTERMINISME SEXUEL	38
1.2.2. LES GÈNES NÉCESSAIRES À LA FORMATION DES GONADES (BARBAUX <i>ET AL</i> , 1995 [4] ; SCHAFFER AND GOODFELLOW, 1996 [109] ; MOREL <i>ET AL</i> , 1997 [83] ; REY AND JOSSO, 1997 [99])	40
1.3. LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE L'APPAREIL URINAIRE	47
1.3.1. LE PRONÉPHROS	47
1.3.2. LE MÉSONÉPHROS	47
1.3.3. LE MÉTANÉPHROS	48
1.4. DONNÉES MOLÉCULAIRES SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU PRONÉPHROS, DU MÉSONÉPHROS ET DU MÉTANÉPHROS (KUMAR ET AL, 1997 [57])	49
1.5. LE RÔLE DU MÉSONÉPHROS DANS LA MORPHOGENÈSE GONADIQUE	53
1.6. DONNÉES SUR LES CONNAISSANCES STRUCTURELLES DU MÉSONÉPHROS	53
1.7. LA RECONSTRUCTION TRIDIMENSIONNELLE EN BIOLOGIE À PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES SÉRIÉES	56
1.7.1. LA RECONSTRUCTION D'OBJETS BIOLOGIQUES : APPROCHE « HISTORIQUE » (UDUPA, 1991 [124])	56
1.7.2. LA RECONSTRUCTION D'OBJETS BIOLOGIQUES : APPROCHE « INFORMATIQUE »	58
1.7.3. LES DIFFÉRENTS MODELEURS UTILISÉS DANS LE DOMAINE DE LA BIOLOGIE	68

2.MATÉRIELS ET METHODES	78
<hr/>	
2.1. LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE EMPLOYÉ	78
2.1.1. ECHANTILLONS HUMAINS	78
2.1.2. ÉCHANTILLONS MURINS	79
2.2. SÉLECTION DE L'OUTIL INFORMATIQUE	88
2.2.1. ESSAIS AVEC VISIO 3D	88
2.2.2. ESSAIS AVEC MEDICAD	88
2.2.3. ESSAIS AVEC GOCAD	89
2.3. LES MÉTHODES DE RECONSTRUCTION 3D DE LA RÉGION MÉSONÉPHRITIQUE À L'AIDE DU LOGICIEL GOCAD	90
2.3.1. L'ACQUISITION DES DONNÉES	90
2.3.2. LA SEGMENTATION	90
2.3.3. LA MODÉLISATION	92
2.4. L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE (TABLEAU 10)	112
3. RÉSULTATS	113
<hr/>	
3.1. RECONSTRUCTIONS 3D DES MÉSONÉPHROS D'EMBRYONS HUMAINS	113
3.1.1. RECONSTRUCTION 3D D'UN MÉSONÉPHROS GAUCHE DE 1,55 MM D'UN EMBRYON ÂGÉ DE 4 SEMAINES (FIGURE 48)	116
3.1.2. RECONSTRUCTION 3D D'UN MÉSONÉPHROS DROIT DE 1,13 MM D'UN EMBRYON MÂLE ÂGÉ DE 6 SEMAINES (FIGURE 49)	118
3.1.3. RECONSTRUCTION 3D D'UN MÉSONÉPHROS DROIT DE 2,04 MM D'UN EMBRYON FEMELLE ÂGÉ DE 7 SEMAINES (FIGURE 50)	120
3.1.4. ANALYSE MORPHOMÉTRIQUE DES MÉSONÉPHROS	121
3.1.5. LES STRUCTURES GLOMÉRULAIRES	128
3.1.6. DISCUSSION	129
3.1.7. CONCLUSION : RÉFLEXIONS SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MÉSONÉPHROS HUMAIN	130
3.2. LA RECONSTRUCTION 3D DES MÉSONÉPHROS MURINS	132
3.2.1. RÉSUMÉ DES OBSERVATIONS DES RECONSTRUCTIONS 3D DE MÉSONÉPHROS D'EMBRYONS MURINS	133
3.2.2. LES MÉSONÉPHROS RECONSTRUITS	134
3.2.3. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNÉES	187
3.2.4. CONCLUSION : RÉFLEXIONS SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MÉSONÉPHROS MURIN	201

4. DISCUSSION	222
4.1. LES APPORTS ET LES LIMITES DE LA MÉTHODOLOGIE	222
4.1.1. DANS LE MÉSONÉPHROS D'EMBRYON HUMAIN	222
4.1.2. DANS LE MÉSONÉPHROS D'EMBRYON MURIN	224
4.2. DÉVELOPPEMENT ET ORGANISATION DES CONNEXIONS URO-GÉNITALES D'ORIGINE MÉSONÉPHRITIQUE (TABLEAUX 33 ET 34)	225
4.2.1. DANS LES MÉSONÉPHROS D'EMBRYONS HUMAINS	228
4.2.2. DANS LES MÉSONÉPHROS D'EMBRYONS MURINS	229
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	232
5.1. LES MÉSONÉPHROS HUMAINS RECONSTRUITS	232
5.2. LES MÉSONÉPHROS MURINS RECONSTRUITS	233
5.3. APPORTS DE CETTE ÉTUDE DANS LE RÔLE DU MÉSONÉPHROS DANS L'ENGAGEMENT DE LA VOIE DE DÉVELOPPEMENT DE LA GONADE.	236
5.4. LES DOMAINES D'APPLICATIONS	237
BIBLIOGRAPHIE	238
ABRÉVIATIONS	255
ANNEXE	256

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentations graphiques du mésonéphros d'embryons humains de 3,5 mm (a) (Mac Callum, 1902), et de 5,5 mm de longueur (b) (Shikinami, 1926).....	17
Figure 2 : Représentations graphiques du mésonéphros d'embryons humains de 8 mm (a) et de 14,6 mm de longueur (b) (Shikinami, 1926).	19
Figure 3 : Représentations graphiques du mésonéphros d'embryons humains mâle de 31 mm (a) et femelle de 36 mm de longueur (b) (Altschule, 1930).....	22
Figure 4 : Représentations graphiques de mésonéphros d'embryons murins de 10,5 jours (a), de 11,5 jours (b), de 12 jours (c), d'un embryon mâle de 13 jours (d), d'un embryon femelle de 13,5 jours (e) et d'un embryon femelle de 14,5 jours (f) (Bovy, 1929).....	23
Figure 5 : Reconstruction d'un embryon humain de 5 semaines avec ses deux mésonéphros (Machin <i>et al</i> , 1996).....	24
Figure 6 : Section transversale de la région abdominale d'un embryon de mammifères, au niveau du mésonéphros (Raynaud, 1969).	27
Figure 7 : Schéma de la formation de gonades à partir d'un « amas épithélial » (Raynaud, 1969)..	29
Figure 8 : Coupes schématiques illustrant la différenciation des gonades indifférenciées en testicule ou en ovaire (Moore, 1974).	30
Figure 9 : Migration des cellules germinales (Moore, 1974).....	33
Figure 10 : Transformation des conduits génitaux de la gonade indifférenciée en des voies génitales du testicule et de l'ovaire (Byskov and Høyer, 1988).....	35
Figure 11 : Schéma de la structure du gène SRY humain (Vilain <i>et al</i> , 1992 ; Barbaux <i>et al</i> , 1995).	41
Figure 12 : Modèle d'action de SOX-9 dans la détermination testiculaire et dans la chondrogenèse (Graves, 1997).	45
Figure 13 : Hypothèse du contrôle de la détermination du sexe par l'interaction des gènes SRY et SOX (Graves, 1998).....	45
Figure 14 : Situation des gènes impliqués dans la détermination sexuelle chez l'humain (Schafer and Goodfellow, 1996 ; Morel <i>et al</i> , 1997).	46
Figure 15 : Modèle en fil de fer d'un cube à l'aide de 12 arêtes: (1-2, 2-3, 3-4, ...) et de 8 sommets.	60
Figure 16 : Modèle surfacique d'un cube à l'aide de 6 faces : (1-2-3-4, 4-3-7-6, 6-7-8-5, 5-8-2-1, 8-7-3-2, 1-4-6-5), de 12 arêtes et de 8 sommets.....	61
Figure 17 : Modèle volumique d'un cube à l'aide de 5 tétraèdres : (1-2-4-5, 2-3-4-7, 5-7-8-2, 5-7-6-4, 5-7-2-4) et des précédentes caractéristiques.	61
Figure 18 : Triangulation entre deux coupes successives.....	63
Figure 19 : Représentation d'un cube avec élimination des faces cachées.	65
Figure 20 : Représentation mathématique du comportement de la lumière.....	67
Figure 21 : Représentation graphique d'une unité néphrique d'un mésonéphros d'embryon humain de 5,5 semaines d'âge (Dingemanse and Lamers, 1994).....	70
Figure 22 : Reconstruction tridimensionnelle par empilement de contours de coupes sériées du cœur embryonnaire (Verbeek <i>et al</i> , 1995).	71
Figure 23 : Réalisations à l'aide de STEREOCON (Marko and Leith, 1996).....	73

Figure 24 : Reconstructions à l'aide d'IMOD (Kremer <i>et al</i> , 1996).....	74
Figure 25 : Représentation en fil de fer du cordon ombilical (Ongaro <i>et al</i> , 1991).....	77
Figure 26 : A partir d'un empilement de contours (a), le maillage du tube nerveux et de la notochorde est réalisé avec une représentation en fil de fer (b) (Ongaro <i>et al</i> , 1991).....	77
Figure 27 : Coupes histologiques transversales du mésonéphros humain de 4 semaines (A-B) (x 60),	80
Figure 28 : Coupes histologiques longitudinales du mésonéphros humain de 6 semaines (A-C) (x 60),.....	80
Figure 29 : Coupes histologiques transversales du mésonéphros humain de 7 semaines (A-F) (x 60).	80
Figure 30 : Coupe histologique d'un mésonéphros mâle murin de 12,5 jours où les tubules mésonéphritiques sont visibles (x 160),	86
Figure 31 : Coupe histologique d'un mésonéphros mâle murin de 12,5 jours où la région gonadique présente le début de la formation des cordons séminifères et où l'albuginée s'épaissit (x 160).	86
Figure 32 : Coupe histologique d'un mésonéphros femelle murin de 14,5 jours (x160),.....	87
Figure 33 : Coupe histologique d'un mésonéphros mâle de 15,5 jours où les cordons séminifères sont bien visibles (x160).	87
Figure 34 : Schématisation de la discrétisation.	93
Figure 35 : Résolution de la discrétisation.....	94
Figure 36 : Schéma de la structure d'un triangle <i>trgl-t</i>	96
Figure 37 : Orientation des triangles <i>trgl-t</i>	96
Figure 38 : Reconstruction d'un simple tubule.	98
Figure 39 : Représentation schématique de la reconstruction à partir de coupes histologiques sériées.	99
Figure 40 : Schématisation de la reconstruction d'une surface ré-entrante.....	100
Figure 41 : Zone d'imbrication entre la surface d'un simple tubule et celle d'un embranchement de 3 tubules (a), suivi de l'effet du lissage sur cette zone (b).	102
Figure 42 : Exemple de topologies possibles pour un carré : 1 atome avec 4 voisins (a), ou 1 atome avec 8 voisins (b).....	106
Figure 43 : Portion de courbe Ψ d'un contour discrétisé.	107
Figure 44 : Schématisation de la rugosité d'une portion de courbe.	107
Figure 45 : ψ' courbe lissée de ψ , sans <i>fuzzy control nodes</i> (a, b), avec <i>fuzzy control nodes</i> (c).	109
Figure 46 : Ensemble de nœuds connectés au nœud k dans le cas d'une surface triangulée.	111
Figure 47 : Représentation de la rugosité dans le cas d'une surface triangulée.....	111
Figure 48 : Reconstruction 3D d'un mésonéphros droit de 1,55 mm d'un embryon humain de 4 semaines.	115
Figure 49 : Reconstruction 3D d'un mésonéphros gauche de 1,13 mm d'un embryon humain de 6 semaines.	117

Figure 50 : Reconstruction 3D d'un mésonéphros gauche de 2,04 mm d'un embryon humain de 7 semaines.	119
Figure 51 : Méthode de calcul d'une surface à partir de 3 segments (AB, BC, CA).....	122
Figure 52 : Représentation du volume associé de la surface d'un triangle ABC et de sa projection sur le plan xoy.....	122
Figure 53 : Evolution des longueurs, surfaces et volumes des différentes parties de 2 unités rostrales.....	126
Figure 54 : Evolution des longueurs, surfaces et volumes des différentes parties de 2 unités néphriques caudales.....	127
Figure 55 : Reconstruction 3D d'une unité néphrique connectée au canal de Wolff d'un mésonéphros humain de stade 17.	128
Figure 56 : Mésonéphros 1 à 4 d'embryons mâles de 10,5 jours	138
Figure 57 : Mésonéphros 5 à 8 d'embryons mâles de 10,5 jours	140
Figure 58 : Mésonéphros 9 d'un embryon mâle et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 10,5 jours.....	142
Figure 59: Notion de rotation rostogyre et caudogyre des tubules mésonéphritiques par rapport à l'orientation d' un embryon de 9 jours (Davidson <i>et al</i> , 1998).	145
Figure 60 : Mésonéphros 1 à 3 des d'embryons mâles de 11,5 jours	148
Figure 61 : Mésonéphros 4 à 6 d'embryons mâles de 11,5 jours.	150
Figure 62 : Mésonéphros 7 à 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 11,5 jours.....	152
Figure 63 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 12,5 jours.	156
Figure 64 : Mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 12,5 jours.	158
Figure 65 : Mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et de mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 12,5 jours.....	160
Figure 66 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 13,5 jours.	165
Figure 67 : Mésonéphros 4 à 9 d'embryons mâles de 13,5 jours.	167
Figure 68 : Mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 13,5 jours.	169
Figure 69 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles 1 de 14,5 jours.	173
Figure 70 : Mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 14,5 jours.	175
Figure 71 : Mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 14,5 jours.....	177
Figure 72 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 15,5 jours.	181
Figure 73 : Mésonéphros de 4 à 7 d'embryons mâles de 15,5 jours.	183
Figure 74 : Mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 15,5 jours.....	185
Figure 75 : Evolution du volume des tubules mésonéphritiques <u>non liés</u> au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).....	192
Figure 76 : Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques <u>non liés</u> au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).....	193

Figure 77 : Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques <u>non liés</u> au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).....	194
Figure 78 : Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques <u>non liés</u> et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).	195
Figure 79 : Evolution du volume des tubules mésonéphritiques <u>liés</u> au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).	196
Figure 80 : Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques <u>liés</u> au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).	197
Figure 81 : Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques <u>liés</u> au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).....	198
Figure 82 : Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques <u>liés</u> et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).....	199
Figure 83 : Origine des tubules isolés rostraux à partir des mésonéphros 7 et 9 d'embryons mâles appartenant à une même portée de 12,5 jours.....	203
Figure 84 : Schématisation hypothétique d'un mécanisme d'apparition du tubule spiralé par un grand nombre de mitoses.....	206
Figure 85 : Représentation des rotations rostogyre et caudogyre à la suite d'une bifurcation.....	207
Figure 86 : Schématisation hypothétique du 1 ^{er} et 2 ^{ème} mécanisme d'apparition d'une branche rostogyre ou caudogyre à la suite d'une bifurcation.	210
Figure 87 : Hypothèse de la formation d'une spirale rostogyre suite à une bifurcation.....	211
Figure 88 : Proposition de formation d'une structure réticulée à partir de 4 bifurcations dans un mésonéphros d'embryon femelle de 11,5 jours (mésonéphros 11 ; Figure 62).	214
Figure 89 : Arrangement des tubules dans un mésonéphros d'embryon mâle de 11,5 jours, où 4 bifurcations se dégagent du canal de Wolff (mésonéphros 3 ; Figure 60).....	215
Figure 90 : Proposition de formation d'une structure réticulée à partir de 3 bifurcations dans un mésonéphros d'embryon femelle de 13,5 jours (mésonéphros 11 ; Figure 68).	216
Figure 91 : Arrangement des tubules dans un mésonéphros d'un embryon mâle où seules 3 bifurcations émergentes du canal de Wolff persistent à 13,5 jours (mésonéphros 1 ; Figure 66).	217
Figure 92 : Mécanisme de formation du rete testis sur un mésonéphros d'un embryon mâle de 15,5 jours.....	220
Figure 93 : Mécanisme de formation du rete ovarii dans un mésonéphros d'un embryon femelle de 15,5 jours.....	221

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Correspondances des stades étudiés.	78
Tableau 2 : Identification des mésonéphros étudiés.	79
Tableau 3 : Durée des bains en fonction de l'âge des embryons.	84
Tableau 4 : Mésonéphros d'embryons de 10,5 jours.	84
Tableau 5 : Mésonéphros d'embryons de 11,5 jours.	84
Tableau 6 : Mésonéphros d'embryons de 12,5 jours.	85
Tableau 7 : Mésonéphros d'embryons de 13,5 jours.	85
Tableau 8 : Mésonéphros d'embryons de 14,5 jours.	85
Tableau 9 : Mésonéphros d'embryons de 15,5 jours.	85
Tableau 10 : Présentation des différents outils informatiques utilisés.	112
Tableau 11 : Répartition numérique des différents tubules mésonéphritiques pour les 3 mésonéphros humains.	114
Tableau 12 : Longueurs de chacune des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux.	123
Tableau 13 : Surfaces de chacune des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux.	124
Tableau 14 : Volumes de chacune des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux.	124
Tableau 15 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 4 d'embryons mâles de 10,5 jours.	139
Tableau 16 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 5 à 8 d'embryons mâles de 10,5 jours.	141
Tableau 17 : Caractéristiques morphométriques du mésonéphros 9 d'embryon mâle et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 10,5 jours.	143
Tableau 18 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 11,5 jours.	149
Tableau 19 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 6 d'embryons mâles de 11,5 jours.	151
Tableau 20 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 7 à 9 d'embryons mâles et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 11,5 jours.	153
Tableau 21 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 12,5 jours.	157
Tableau 22 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 12,5 jours.	159
Tableau 23 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 12,5 jours.	161
Tableau 24 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 13,5 jours.	166
Tableau 25 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 9 d'embryons mâles de 13,5 jours.	168
Tableau 26 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 13,5 jours.	170

Tableau 27 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 14,5 jours.....	174
Tableau 28 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 14,5 jours.....	176
Tableau 29 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 14,5 jours.....	178
Tableau 30 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 15,5 jours.....	182
Tableau 31 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 15,5 jours.....	184
Tableau 32 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 15,5 jours.	186
Tableau 33 : Schéma récapitulatif des données obtenues par l'interprétation des reconstructions 3D réalisées.	226
Tableau 34 : Représentation schématique des caractéristiques des 2 espèces.....	227

INTRODUCTION

La mise en place du mésonéphros aboutit à la formation de petites masses cellulaires métamérisées, appelées néphrotomes, qui se creusent en vésicules néphrotomiales. Celles-ci s'allongent et forment les tubules mésonéphritiques chez les mammifères. Le mésonéphros ou corps de Wolff est longé sur sa face externe par le canal de Wolff, canal collecteur, qui débouche dans le cloaque. Chez l'Homme, l'extrémité médiale des tubules mésonéphritiques, se renfle et s'organise en chambre glomérulaire autour d'un peloton de capillaires développés sur une anse artérielle venue de l'aorte ; leur extrémité latérale s'ouvre dans le canal de Wolff. Chez la Souris, la constitution du mésonéphros évolue de façon similaire mais en l'absence de chambre glomérulaire.

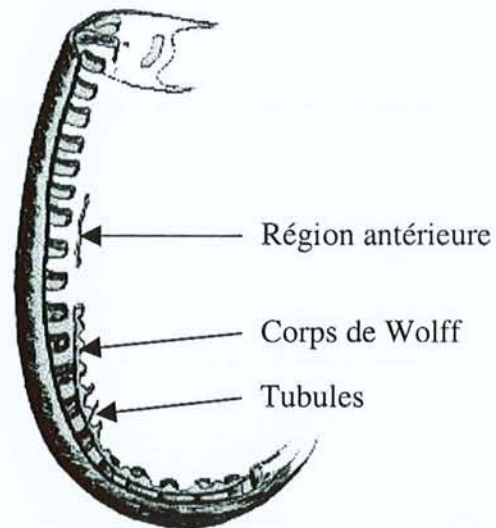
Si les événements embryonnaires de la formation des tubules mésonéphritiques sont parfaitement décrits chez les mammifères, leur organisation au cours du développement est encore mal connue.

Le but de ce présent travail est d'apporter des informations sur l'organisation des tubules mésonéphritiques, au cours du développement embryonnaire et sur leur participation dans la formation des connexions uro-génitales.

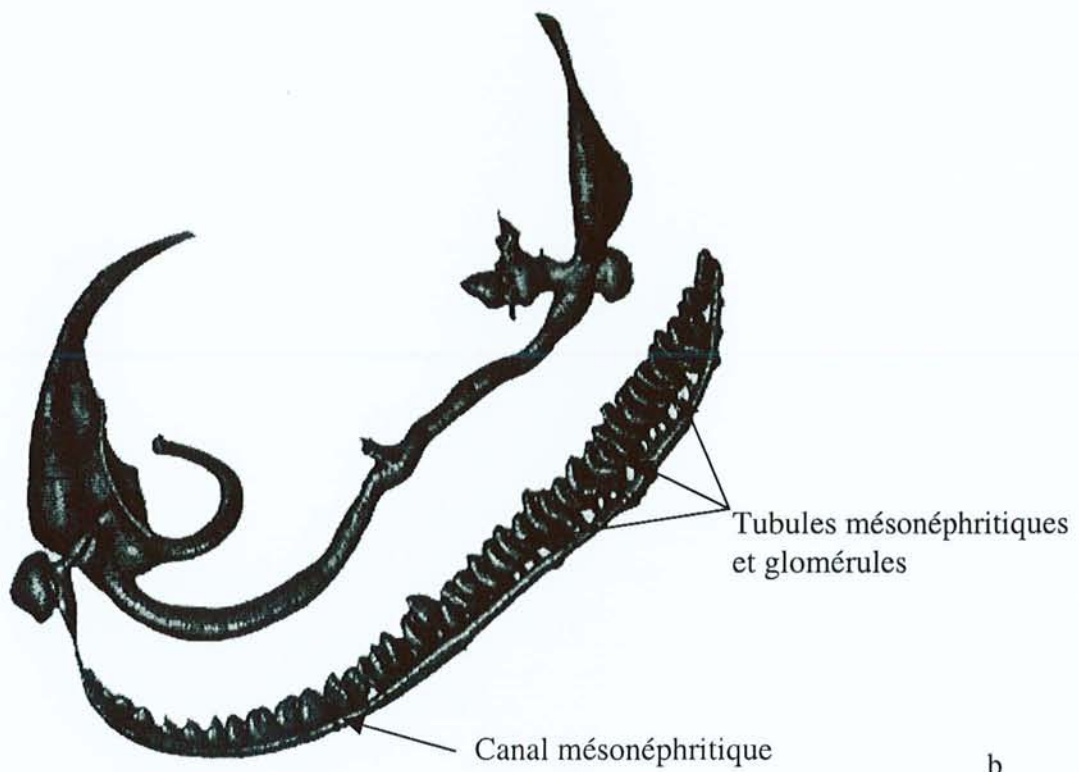
Chez l'Homme, les seules reconstructions précises du mésonéphros avec ses tubules ont été réalisées par une méthode de représentation graphique portant sur les 12 premières semaines de développement (Figures 1 à 3 ; Mac Callum, 1902 [64]; Shikinami, 1926 [113] ; Altschule, 1930 [1]).

Chez la Souris, par la même méthode, J. Bovy a suivi le développement simultané du corps de Wolff, de la crête génitale et de leurs connexions réciproques. Ce travail a montré « que la Souris rentre dans la catégorie des espèces où les connexions uro-génitales sont de nature wolffienne » (Figure 4 ; Bovy, 1929 [8]).

Il fallu attendre l'essor de l'informatique pour envisager d'aborder la reconstruction d'une structure aussi complexe. Même les travaux récents (Figure 5 ; Machin *et al*, 1996 [65]) représentent le mésonéphros d'un embryon humain de 5 semaines sous la forme d'une bandelette sans considérer les tubules mésonéphritiques.



a



b

Figure 1 : Représentations graphiques du mésonéphros d'embryons humains de 3,5 mm (a) (Mac Callum, 1902), et de 5,5 mm de longueur (b) (Shikinami, 1926).

Cette situation s'explique par diverses raisons :

- La taille des embryons empêche l'exploitation d'images radiographiées, et restreint l'observation par simple dissection ; la taille proche du millimètre du mésonéphros contraint l'observation des événements morphologiques d'embryogénèse à une analyse microscopique.
- L'analyse microscopique impose la confection de coupes histologiques transversales ou coronales, et parcellise définitivement le matériel étudié. Les cultures d'organes sont difficiles et ne permettent pas l'étude du développement du mésonéphros.
- La variabilité individuelle du développement embryonnaire doit être prise en compte, cumulée à la complexité des tubules mésonéphritiques, elle ne simplifie pas l'étude du mésonéphros humain et explique l'intérêt du modèle murin.
- La reconstruction 3D d'un objet biologique nécessite des coupes sériées histologiques avec une phase d'acquisition imposante. L'outil informatique permet de détecter et de résoudre les problèmes posés par les embranchements complexes des tubules mésonéphritiques.

L'intérêt s'est porté, tout d'abord, sur 3 embryons humains, puis sur 72 embryons murins du fait de la disponibilité d'un plus grand nombre de prélèvements.

Ce travail est présenté de la manière suivante :

Le chapitre 1 présente une étude bibliographique sur l'appareil uro-génital et sur la reconstruction 3D en biologie.

Le chapitre 2 est consacré à la description des techniques de préparations histologiques employées pour les échantillons humains et murins et expose la méthode requise au moyen du logiciel gOcad (geOlogical computer aided-design) pour parvenir à une approche tridimensionnelle de la région mésonéphritique.

Le chapitre 3 est tourné vers une description des reconstructions 3D obtenus, une présentation des résultats et une interprétation des mécanismes observés qui appuieront la discussion.

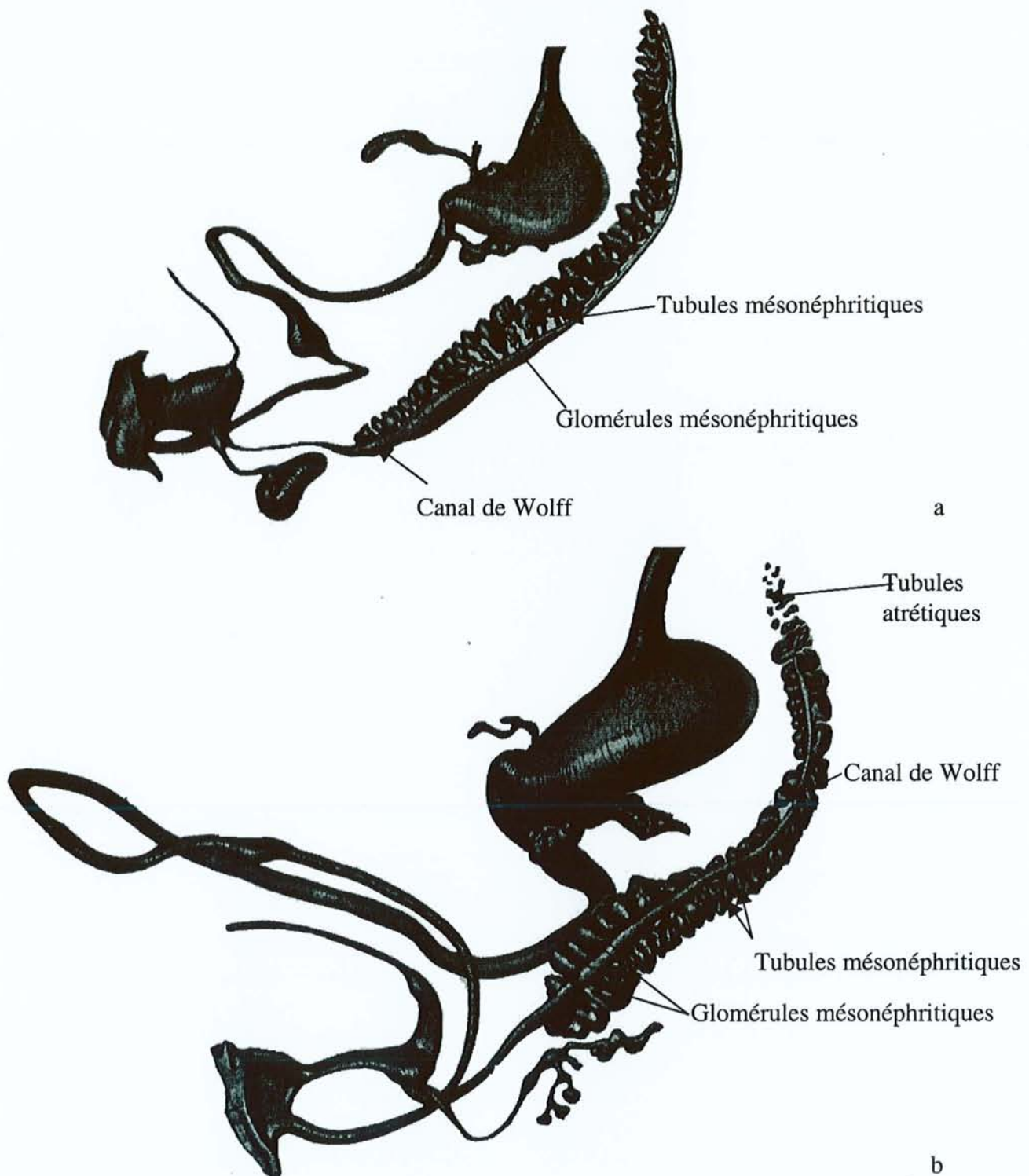


Figure 2 : Représentations graphiques du mésonéphros d'embryons humains de 8 mm (a) et de 14,6 mm de longueur (b) (Shikinami, 1926).

L'étude présentée comporte deux objectifs principaux :

- Elle tente dans un premier temps de dresser un état des lieux des méthodes envisagées, une définition plus fine du protocole choisi et une description réaliste du mésonéphros au cours de son développement. Cette évaluation descriptive des objets reconstruits est menée sur le mésonéphros humain et murin. Tout d'abord, le mésonéphros de 3 embryons humains de 4, 6 et 7 semaines d'âge (de 7,4 mm, 11 mm et 16 mm de longueur) est reconstruit. Il s'agit d'obtenir plus d'informations sur la forme des tubules et leur nombre. Le nombre restreint d'embryons humains a limité leur étude. L'apport considérable des reconstructions a motivé une extension de l'étude par le modèle murin. Le développement du mésonéphros murin a donc été envisagé de 10,5 à 15,5 jours embryonnaires sur 24 portées différentes. Le suivi des différents mésonéphros reconstruits permet de dégager des données numériques et d'examiner l'existence de points majeurs au cours du développement.
- L'étude s'applique, ensuite, à mettre en valeur l'application au mésonéphros des techniques de reconstruction avec une adaptation optimale du logiciel gOcad. Puis, par une étude comparative des paramètres morphologiques mesurés, des analyses statistiques sont réalisées en fonction du sexe et de l'âge. Ces études ouvriront la voie à des réflexions sur les mécanismes de développement du mésonéphros.

Les 3 modèles humains réalisés apportent des informations complémentaires aux représentations graphiques déjà effectuées par Mac Callum, 1902 [64]; Shikinami, 1926 [113]; Altschule, 1930 [1]. Grâce aux 3 reconstructions obtenues, le nombre, l'organisation et le mode de formation des tubules mésonéphritiques ont pu être réévalués et étudiés. Le peu d'exemplaires d'embryons humains a restreint cette étude et l'a guidé vers une exploration du mésonéphros murin dont l'extension de l'étude à un plus grand nombre d'embryons fut plus aisée. Chez la Souris, les reconstructions obtenues, permettent de mettre en évidence l'existence d'un aspect différencié mâle-femelle du mésonéphros et de comprendre les mécanismes intervenant dans la formation des tubules et des futurs connexions avec le rete.

L'étude a permis de tester une première hypothèse qui implique une différenciation mésonéphritique préalable à la différenciation testiculaire.

L'étude pose une seconde hypothèse sur l'existence de plusieurs mécanismes internes et externes intervenant dans la formation des tubules mésonéphritiques ainsi que dans leur arrangement au cours du développement.

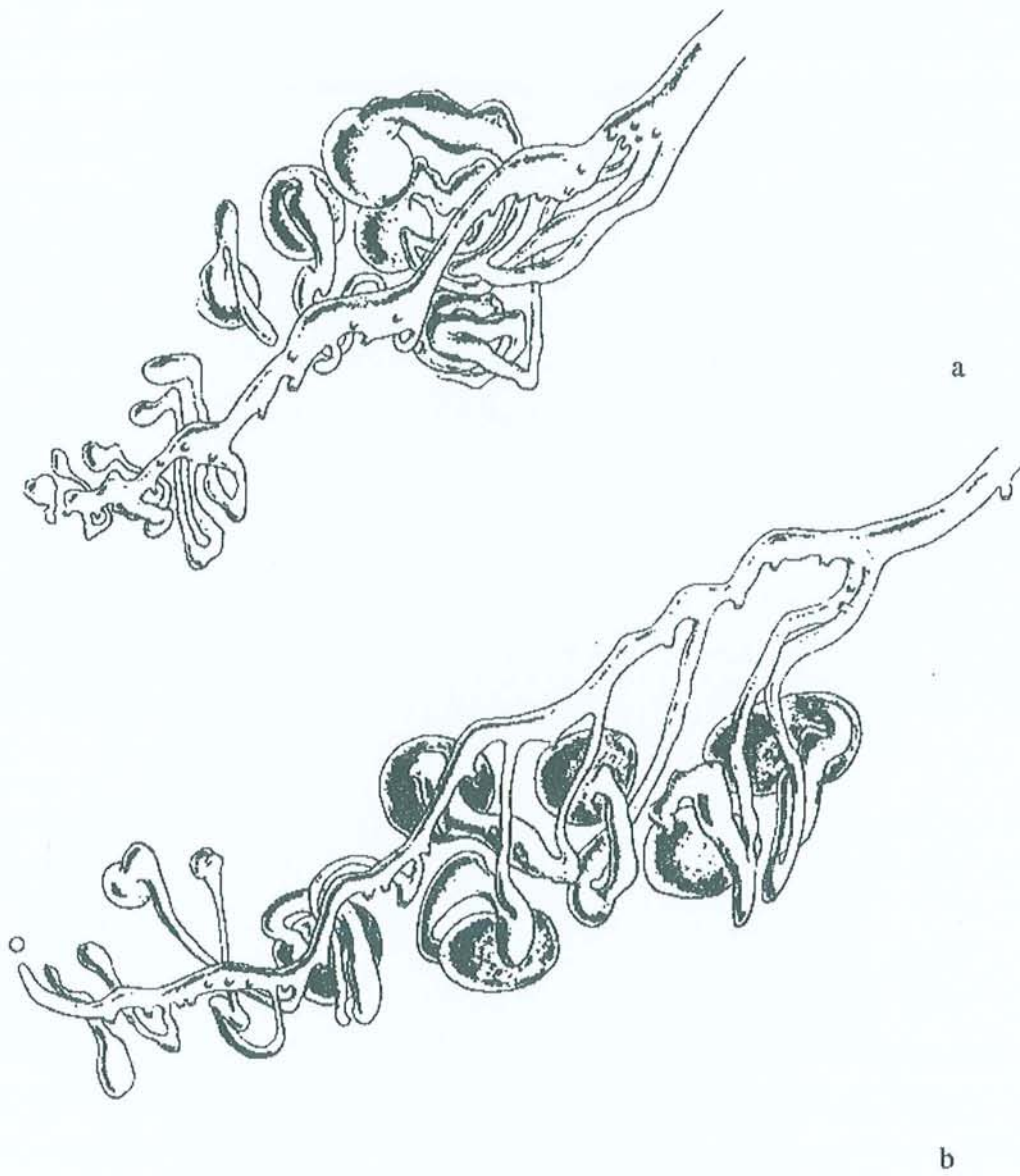


Figure 3 : Représentations graphiques du mésonéphros d'embryons humains mâle de 31 mm (a) et femelle de 36 mm de longueur (b) (Altschule, 1930).

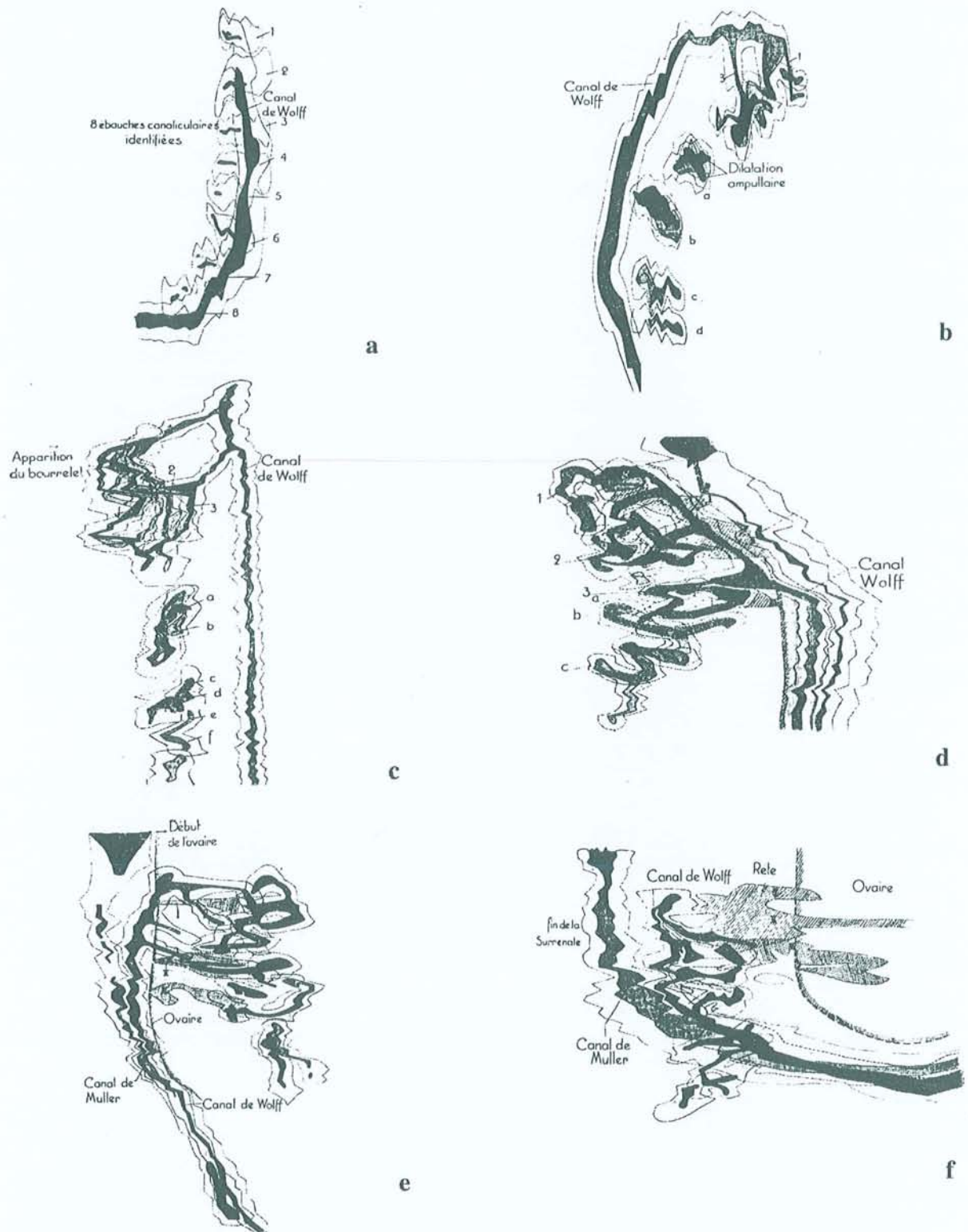


Figure 4 : Représentations graphiques de mésonéphros d'embryons murins de 10,5 jours (a), de 11,5 jours (b), de 12 jours (c), d'un embryon mâle de 13 jours (d), d'un embryon femelle de 13,5 jours (e) et d'un embryon femelle de 14,5 jours (f) (Bovy, 1929).

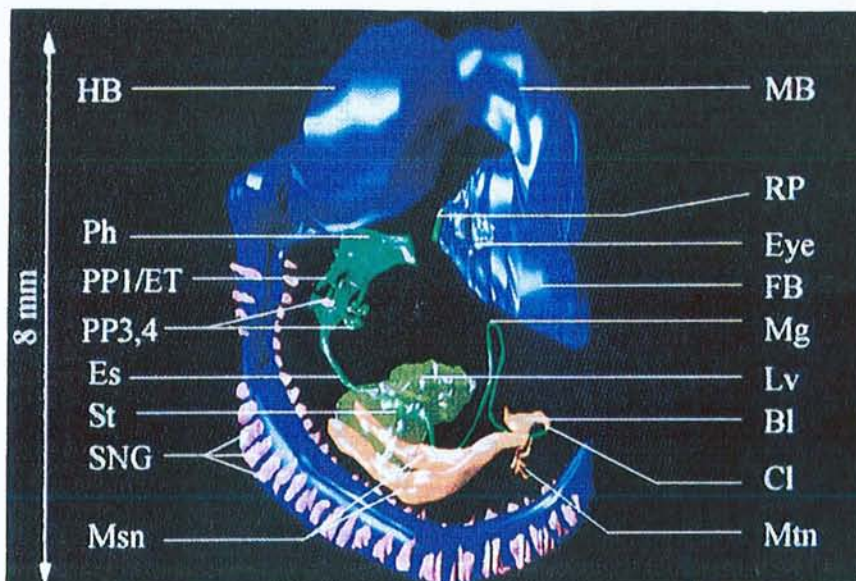


Figure 5 : Reconstruction d'un embryon humain de 5 semaines avec ses deux mésonéphros (Machin *et al*, 1996).

(Bl : bladder /vessie, Cl : cloaca/cloaque, Es : oesophagus/œsophage, Eye : eye/œil, FB : forebrain/cerveau antérieur, HB : hindbrain/cerveau postérieur, Lv : liver/foie, MB : midbrain/cerveau moyen, Mg : midgut/intestin moyen, Msn : mesonephroi/mésonéphros, Mtn : metanephroi/métanéphros, Ph : pharynx/pharynx, PP1/ET : 1st pharyngeal pouch/ eustachian tube/ 1^{ère} poche pharyngienne/trompe d'Eustache, PP3/4 third and fourth pharyngeal pouches/3^{ème} et 4^{ème} poches pharyngiennes, RP : Rathke's pouch/Poche de Rathke, St : stomach/estomac, SNG : spinal nerve ganglion/crête neurale).

1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sur le plan fonctionnel, le système uro-génital se divise en deux appareils distincts :

- l'appareil urinaire qui joue un rôle d'élimination des déchets hydrosolubles,
- l'appareil génital qui participe à la fonction de reproduction.

Sur le plan embryologique puis anatomique, les deux appareils sont étroitement associés. Tous deux se développent à partir d'une crête mésoblastique commune, formée par la prolifération du mésoblaste le long de la paroi postérieure de la cavité abdominale. Cependant, l'embryogenèse des deux appareils se déroule selon des schémas très différents. L'organogenèse rénale est classiquement décrite en trois étapes se succédant chronologiquement et anatomiquement selon l'axe rostro-caudal de l'individu. Le développement de la gonade s'effectue dans une région anatomique plus restreinte.

1.1. Le développement embryonnaire de l'appareil génital

L'appareil génital des mammifères est un système complexe, formé par le développement concerté de constituants distincts :

- les gonades,
- les canaux de Wolff et de Müller (les conduits génitaux),
- les dérivés du sinus uro-génital et les organes génitaux externes.

L'origine embryologique de ces constituants est différente :

- mésodermique pour les gonades et les conduits génitaux,
- endodermique pour les cellules germinales et les dérivés du sinus uro-génital,
- endodermique, ectodermique et mésodermique pour les organes génitaux externes et la région vestibulaire.

De plus, les gonades se forment à partir de l'épithélium cœlomique et du mésenchyme sous-jacent, mais à ces tissus viennent s'incorporer les cellules germinales d'origine extra-gonadique. Les voies excrétrices comprennent un conduit purement sexuel, le conduit de Müller ; mais une partie du système rénal embryonnaire (certains tubules mésonéphritiques et le canal mésonéphritique) s'annexe au système génital, pour constituer les connexions uro-génitales et le conduit de Wolff, futur canal déférent du mâle (Raynaud, 1969 [98]).

1.1.1. Le développement des glandes génitales

1.1.1.1. La formation de la gonade

Chez l'embryon, de part et d'autre du mésentère dorsal, la paroi dorsale de la cavité abdominale présente une saillie longitudinale, due au mésonéphros en développement ; c'est sur le bord médian de cette saillie que se différencie, de chaque côté, une aire longitudinale, dans laquelle se forme l'ébauche de la gonade : là, l'épithélium péritonéal s'épaissit en plusieurs assises cellulaires superposées ; cette aire longitudinale fait alors saillie dans le cœlome ; c'est la crête génitale qui se forme à partir d'une ébauche épithéliale (Figure 6 ; Raynaud, 1969 [98]). Dans l'épithélium de cette crête et dans le mésenchyme sous-jacent, viennent se loger les cellules germinales dont l'origine est extra-gonadique. L'épithélium péritonéal épaissi (épithélium germinatif) prolifère de façon continue sur toute sa surface (et non sous forme de cordons) et ses cellules s'enfoncent dans le mésenchyme sous-jacent, pour former, dans les deux sexes, un amas épithélial, en continuité avec l'épithélium cœlomique de recouvrement ; cet amas fait saillie dans la cavité abdominale : c'est l'ébauche de la gonade (crête génitale indifférenciée), qui se rattache par sa partie profonde, à la saillie mésonéphritique. L'ébauche de la gonade est donc, constituée par l'épithélium cœlomique de recouvrement et l'amas épithélial sous-jacent.

1.1.1.2. La différenciation sexuelle de la gonade

Après ce stade, s'effectue la différenciation sexuelle de la gonade (Figure 7 ; Raynaud, 1969 [98] et Figure 8 ; Moore, 1974 [80]).

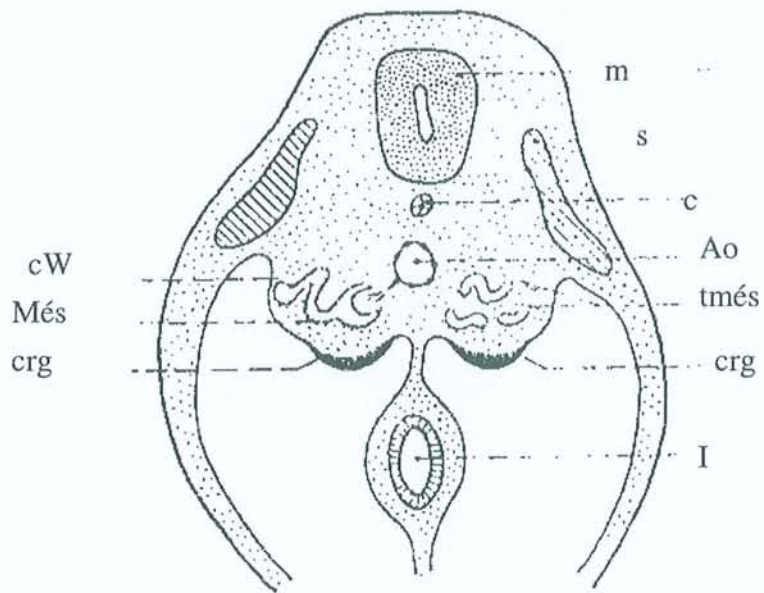


Figure 6 : Section transversale de la région abdominale d'un embryon de mammifères, au niveau du mésonéphros (Raynaud, 1969).

(Ao : aorte, c : corde dorsale, crg: crête génitale, cW : canal de Wolff, I : intestin, m : moelle épinière, Més : mésonéphros, S : somite, tmés : tubule mésonéphritique)

Chez le mâle, l'amas épithélial s'organise en cordons épithéliaux distincts, les cordons sexuels, ébauches des tubules testiculaires, dans lesquelles se logent les cellules germinales qui étaient disséminées dans l'amas épithélial ; en même temps, des assises mésenchymateuses s'insinuant sous l'épithélium germinatif, forment l'ébauche de la tunica albuginea et séparent ainsi complètement les tubules testiculaires, de l'épithélium superficiel. Des îlots de cellules se constituent entre les tubules testiculaires formant le testicule fœtal (Figure 7A-B). Les tubules testiculaires contiennent alors les grandes cellules germinales et de petites cellules épithéliales indifférenciées préexistant dans l'amas épithélial. Plus l'ébauche du testicule se développe, plus elle se raccourcit dans le sens rostro-caudal et s'élargit dans l'axe médio-latéral. Le testicule se sépare progressivement de la saillie mésonéphritique et acquiert un mésentère uro-génital propre encore appelé mésorchium (Figure 7C ; Raynaud, 1969 [98] et Figure 8D ; Moore, 1974 [80]).

Chez la femelle, l'amas épithélial persiste et l'épithélium germinatif s'épaissit en proliférant de manière continue sur toute sa surface ; à un stade plus tardif, dans la partie interne (hilaire) de la gonade, des travées de cellules mésenchymateuses formeront les septa ovarii se dirigeant vers la périphérie et découpant ainsi l'amas en secteurs radiaires. Simultanément, une assise mésenchymateuse sous l'épithélium superficiel formera une lame mince et discontinue. L'amas épithélial de la gonade se transforme en un cortex ovarien épais, comprenant de petites cellules épithéliales et des cellules germinales. Au centre de l'ovaire, apparaissent les cordons du rete et des cellules germinales en dégénérescence (Figure 7A-D).

Ce mode de formation est identique chez la Souris et chez l'Homme.

1.1.2. Les cellules germinales

Dans la gonade en développement apparaissent de grandes cellules sphériques, à large noyau, les cellules germinales. Ces cellules proviennent de territoires embryonnaires éloignés de la crête génitale.

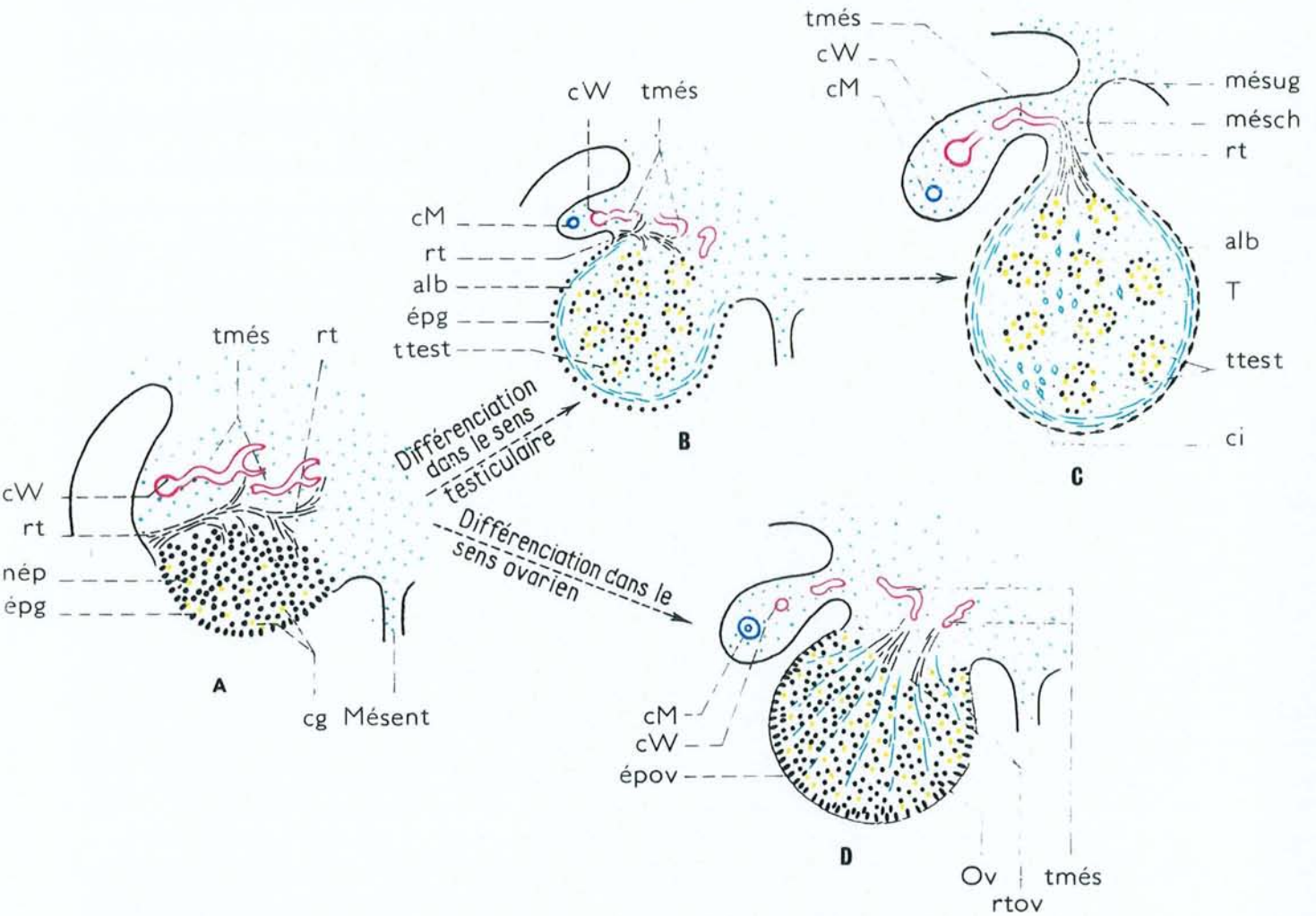


Figure 7 : Schéma de la formation de gonades à partir d'un « amas épithélial » (Raynaud, 1969).

(A : Gonade sexuellement indifférenciée ; l'épithélium germinatif (épg) a proliféré d'une manière continue sur toute sa surface pour former un amas épithélial (nép) ; sur son bord latéral, l'épithélium péritonéal a donné naissance aux cordons du rete (rt) qui unissent l'amas épithélial aux tubules mésonéphritiques (tmés) qui s'ouvrent dans le canal de Wolff (cW). B et C : Différenciation de la gonade en testicule avec en B, des tubules testiculaires (ttest) qui s'organisent à partir des cellules de l'amas épithélial ; l'épithélium germinatif (épg) s'atrophie ; l'albuginée (alb) s'ébauche à partir du mésenchyme sous-jacent à l'épithélium. En C, le testicule (T) est constitué, l'épithélium de recouvrement est formé de cellules plates, l'albuginée s'épaissit, les tubules testiculaires sont formés et des îlots de cellules interstitielles (ci), d'origine mésenchymateuse, ont fait leur apparition entre les tubules. D : Différenciation de la gonade en ovaire : l'amas épithélial est découpé en travées radiaires par des faisceaux conjonctifs, l'épithélium germinatif (épov) persiste avec des cellules hautes et reste en communication, au moins partielle, avec le parenchyme ovarien (cM : canal de Müller, mésug : mésentère urogénital, Mésent : mésentère dorsal, mésch : mésorchium.)

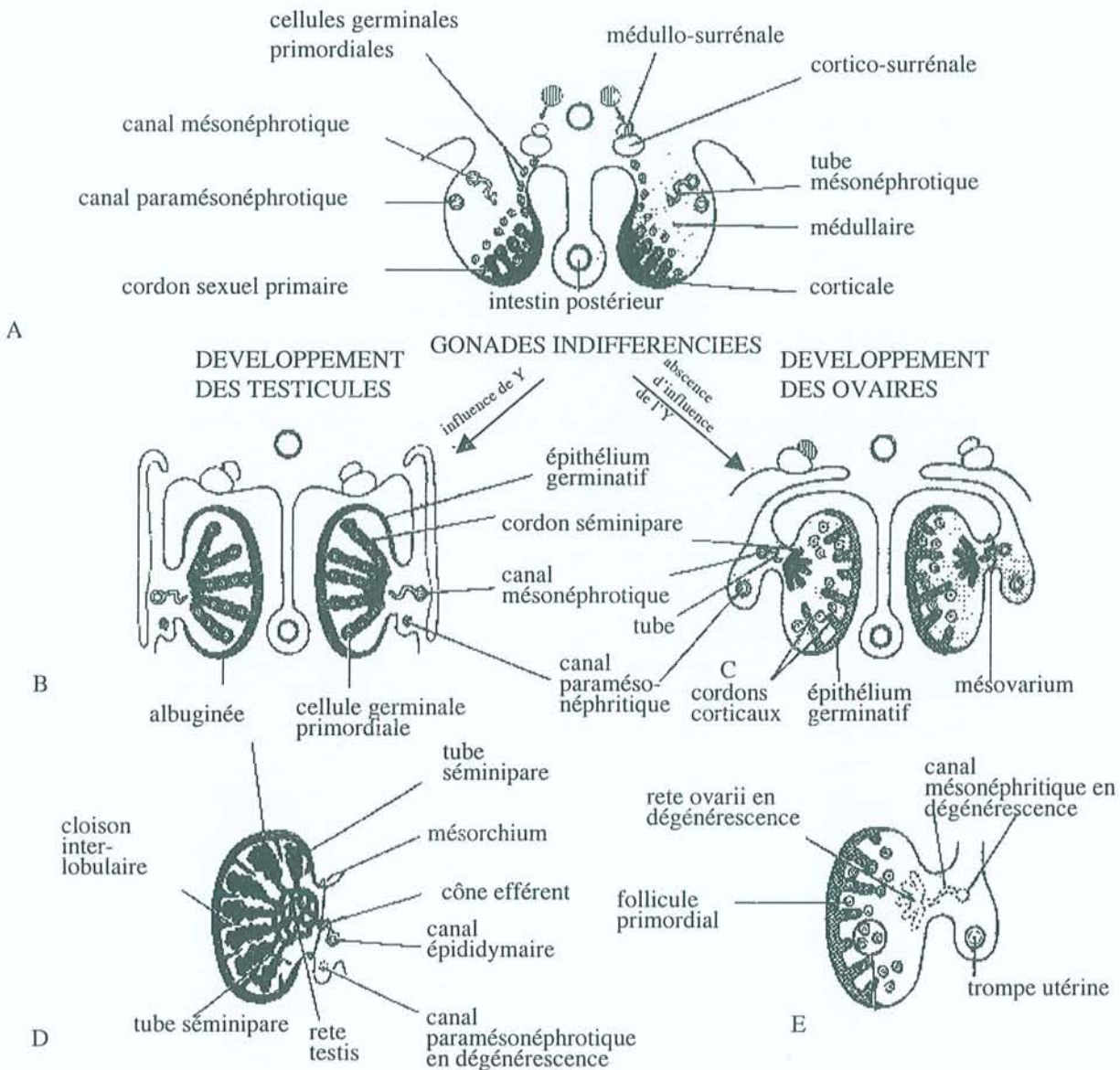


Figure 8 : Coupes schématiques illustrant la différenciation des gonades indifférenciées en testicule ou en ovaire (Moore, 1974).

(A : 6 semaines, montrant les gonades indifférenciées bipotentielles constituées d'une corticale externe et d'une médullaire interne. B : 7 semaines, montrant les testicules se développant sous l'influence du chromosome Y. C : 12 semaines, montrant les ovaires commençant à se développer. Les cordons sexuels secondaires se sont développés à partir de l'épithélium germinatif, déplaçant vers le centre les cordons sexuels primaires, dans le mésovarium où ils forment le rete ovarii rudimentaire. D : Testicule à 20 semaines, montrant le rete testis et les tubes séminipares dérivés des cordons séminipares. Un cône efférent s'est formé à partir d'un tube mésonéphrotique et le canal mésonéphrotique est devenu un canal épидидymaire. E : Ovaire à 20 semaines montrant les follicules primordiaux formés à partir des cordons corticaux, le rete ovarii, dérivé des cordons sexuels primaires et la régression des tubes et du canal mésonéphrotique.)

Chez les mammifères, les cellules germinales primordiales apparaissent d'abord dans la région de l'épithélium endodermique du sac vitellin, sous-jacente au diverticule allantoïdien. A cet endroit, les cellules germinales sont visibles chez l'embryon humain dès la 3^{ème} semaine de développement (Witschi, 1948 [140]) et chez l'embryon de souris au 8^{ème} jour embryonnaire (Mintz, 1957 [75]). Puis, les cellules germinales migrent dans la paroi intestinale, dans le mésentère intestinal et gagnent les crêtes génitales (Figures 8 et 9; Moore, 1974 [80]).

1.1.3. Les connexions uro-génitales

L'ébauche gonadique en formation se met en rapport avec le conduit mésonéphritique par l'intermédiaire d'une série de cordons et de tubules qui constituent les connexions uro-génitales. Ces deux intermédiaires sont le rete et les tubules mésonéphritiques les plus rostraux (Raynaud, 1969 [98]).

1.1.3.1. La formation du rete

Les ébauches du rete se présentent chez l'embryon des deux sexes, sous forme d'un réseau d'étroits cordons cellulaires, unissant les cordons sexuels de la gonade aux tubules du mésonéphros.

Le mode de formation du rete est différent chez l'Homme et la Souris :

- Chez l'Homme :

- Pour von Winiwarter (1910), « Le rete possède une origine wolffienne ; il naît de la capsule externe des corpuscules de Malpighi de la future région épiphorique du corps de Wolff, sous forme de cordons pleins et grêles qui s'avancent vers le hile de la glande sexuelle... Les premiers indices du rete s'observent peut-être déjà chez l'embryon de 14 mm ; ils sont nets à 19 mm ».
- Pour Félix (1912), le rete proviendrait d'un amas cellulaire ou blastème du rete, situé dans la partie profonde de la gonade.

- Chez la Souris :

- Pour Brambell (1928), les tubules mésonéphritiques les plus rostraux forment une capsule de Bowman rudimentaire reliée à l'épithélium cœlomique par un néphrostome ; à la base du néphrostome bourgeonne un petit cordon cellulaire qui donnera le tube du rete et qui va s'unir à un tubule testiculaire dès le 11^{ème} jour. Pour l'embryon femelle, la partie profonde du tissu ovarien s'unit avec les tubules mésonéphritiques les plus rostraux, par le bourgeonnement des canaux néphrostomiaux, à l'origine des cordons constituant le rete ovarii.
- Pour Bovy (1929), le tubule du rete se forme par simple bourgeonnement de l'extrémité de certains tubules mésonéphritiques. Les travées épithéliales s'unissent aux formations épithéliales de la gonade et les connexions uro-génitales représentent des formations wolffiennes.

1.1.3.2. La formation des canaux efférents

Chez les embryons des deux sexes, alors que la plus grande partie du mésonéphros dégénère, un groupe de tubules rostraux, persiste, là les glomérules régressent, disparaissent et les tubules mésonéphritiques amincis deviennent des canaux efférents ; d'un côté, ils communiquent avec les tubules du rete, de l'autre, ils s'ouvrent dans le canal de Wolff (Wilson, 1926 [138] ; Roosen-Runge and Holstein, 1978 [101]).

1.1.4. Les conduits génitaux

Deux paires de conduits excréteurs des gonades se constituent chez l'embryon. Les canaux de Wolff (conduits mésonéphritiques) deviendront les conduits génitaux mâles, tandis qu'ils régresseront chez l'embryon femelle. Les canaux de Müller disparaîtront chez l'embryon mâle et deviendront les voies génitales de l'embryon femelle (Gruenwald, 1941 [38] ; Dyche, 1976 [22] ; 1979 [23] ; Lawrence *et al*, 1992 [59]), (Figure 10 ; Byskov and Høyer, 1988 [13]).

La transformation des conduits génitaux présente un déroulement chronologique propre à l'embryon humain, distinct de celui de l'embryon murin.

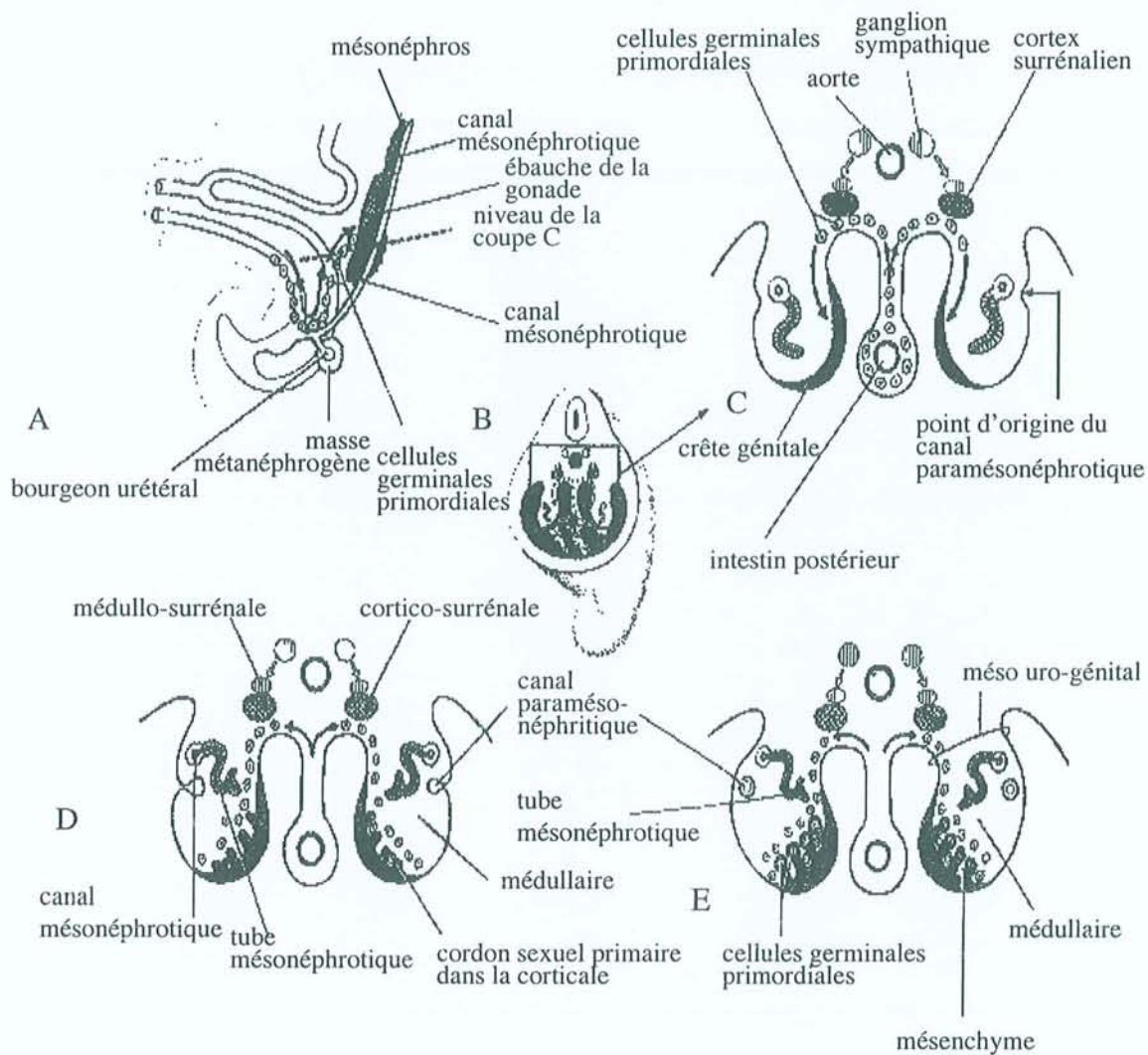


Figure 9 : Migration des cellules germinales (Moore, 1974).

(A : Migration des cellules germinales chez un embryon humain de 5 semaines. B : Situation des crêtes génitales. C : Coupe transversale montrant l'ébauche des surrénales, des crêtes génitales et la migration des cellules germinales primordiales. D : Coupe transversale d'un embryon de 6 semaines montrant les cordons sexuels primaires et les canaux paramésonephritiques en développement. E : Coupe analogue à un stade plus tardif, montrant les gonades au stade indifférencié et les canaux mésonéphritiques et paramésonephritiques.)

Chez l'embryon humain, la formation du conduit mésonéphritique se poursuit chez les embryons mâles alors que chez les embryons femelles, il commence sa régression au stade 30 mm. L'ébauche de la partie rostrale des canaux de Müller apparaît dès le stade 10 mm ; à la fin du 2^{ème} mois, les canaux de Müller sont présents sur toute la longueur du corps de Wolff ; ils atteignent le sinus uro-génital au stade 28 mm. A partir du stade 27 mm, les canaux de Müller régressent chez le mâle (Raynaud, 1969 [98]).

Chez l'embryon murin, le canal de Wolff est complet dès le 9^{ème} jour alors que le canal de Müller commence à apparaître au 12^{ème} jour pour atteindre le sinus uro-génital au 14^{ème} jour (Raynaud, 1942 [97]).

Par ailleurs, l'évolution des conduits génitaux diffère suivant le sexe de l'embryon.

1.1.4.1. Les canaux de Wolff

Chez le mâle, le canal de Wolff persiste et se développe ; sa partie rostrale est en relation avec les tubules testiculaires, par l'intermédiaire des canaux efférents et du rete. La jonction entre les canaux efférents et le canal de Wolff se réalise par de nombreuses sinuosités. Le canal de Wolff constitue alors le canal de l'épididyme ; plus bas il devient le canal déférent qui émet à son extrémité caudale un bourgeon à l'origine de la vésicule séminale. A ce niveau le conduit constitue le canal éjaculateur. Les deux canaux éjaculateurs s'ouvrent dans le sinus uro-génital.

Chez la femelle, les canaux de Wolff s'atrophient progressivement pour disparaître presque entièrement ; cette atrophie débute dans leur partie rostrale et se poursuit caudalement.

1.1.4.2. Les canaux de Müller

Chez le mâle, les canaux de Müller se forment d'abord entièrement et sont continus, depuis l'ostium, jusqu'au sinus uro-génital ; puis ils commenceront à régresser dans leur partie rostrale jusqu'à leur partie caudale. Chez l'embryon mâle ne persiste que les extrémités rostrales et caudales. L'extrémité rostrale formera l'appendix testis ou hydatide sessile alors que le devenir de l'extrémité caudale n'est pas connu de façon précise. Selon certains auteurs, cette extrémité donne l'utricule prostatique, mais d'autres pensent que l'utricule prostatique dérive des tubercules de Müller induits par les canaux de Müller au niveau du sinus urogénital.

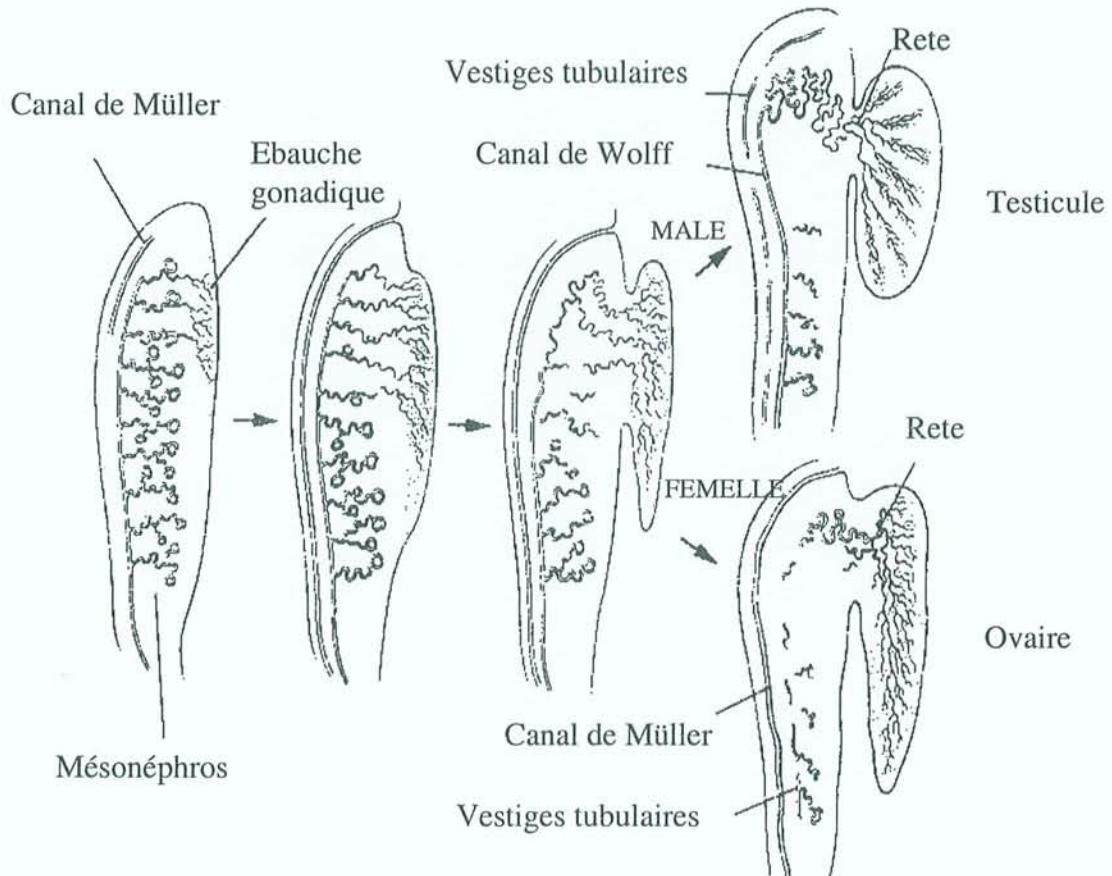


Figure 10 : Transformation des conduits génitaux de la gonade indifférenciée en des voies génitales du testicule et de l'ovaire (Byskov and Høyer, 1988).

Chez la femelle, les extrémités caudales des deux canaux de Müller, d'abord distincts, viennent au contact l'une de l'autre, fusionnent pour constituer un conduit unique, qui formera le corps de l'utérus ou le conduit utéro-vaginal suivant l'espèce.

Le canal de Müller va ensuite se différencier sur son trajet en portions distinctes. Rostralement, l'ostium ouvert dans la cavité abdominale donnera le pavillon relié à la trompe de Fallope qui s'élargit en une corne utérine. Les deux canaux, à leur base, vont fusionner en un corps utérin.

1.1.5. Le devenir du mésonéphros et des voies génitales

Il persiste chez les fœtus des deux sexes, des vestiges des tubules mésonéphritiques et des voies génitales .

1.1.5.1. Les reliquats chez les fœtus mâles

Du mésonéphros persistent trois éléments :

- un tubule rostral qui donne le canalicule crânial aberrant ou l'hydatide de l'épididyme,
- la majorité des tubules qui participe à la formation des canaux efférents,
- les tubules les plus caudaux à l'origine du paradidyme ou organe de Giraldès.

Du canal de Müller persistent trois structures :

- l'extrémité rostrale qui forme l'hydatide de Morgagni,
- quelques vestiges tubulaires de la partie médiane accolés au canal déférent,
- les extrémités caudales des canaux de Müller, à l'origine de l'utricule prostatique.

1.1.5.2. Les reliquats chez les fœtus femelles

Du mésonéphros persistent trois éléments :

- un tubule rostral qui donne le canalicule crânial aberrant,
- une partie des tubules qui contribue aux connexions uro-génitales ou épooaphore,
- les tubules les plus caudaux qui participent à la formation du paroophore.

Le canal de Wolff contribue à la formation de l'époophore dans sa partie rostrale avec l'appendice vésiculaire. L'époophore est formé d'un tronc collecteur provenant de la partie rostrale du canal de Wolff, de canaux flexueux qui se dirigent vers l'ovaire et du rete ovarii qui se prolonge dans l'ovaire par des cordons épithéliaux.

1.2. Le mécanisme moléculaire du déterminisme génétique de la différenciation gonadique

Dans les conditions normales, les gonades de constitution chromosomique XX aboutissent à des ovaires alors que les gonades XY donneront des testicules. Les mécanismes responsables de l'engagement dans une voie de différenciation mâle ou femelle constitue le déterminisme du sexe.

Chez les mammifères, il existe un signal primaire responsable de l'expression différentielle des gènes qui contrôle la détermination sexuelle. Ce signal dépend de la constitution chromosomique des individus, il est impliqué dans le déterminisme primaire et il est localisé sur le chromosome Y (Payen *et al*, 1996 [92]).

Le contrôle initial de la détermination du sexe est essentiellement d'ordre génétique. Le chromosome Y joue un rôle dominant dans le déterminisme du testicule. Indépendamment du nombre de chromosome X, un individu porteur d'un chromosome Y développe des testicules ou des structures testiculaires : les patients 47, XXY atteints du Syndrome de Klinefelter ont un phénotype essentiellement masculin alors que les individus 45, X atteints du Syndrome de Turner présentent un phénotype féminin. Ce serait la présence ou l'absence de chromosome Y qui détermine le sexe (respectivement mâle ou femelle) chez les mammifères. Cependant, certains gènes liés au chromosome Y peuvent se transloquer sur un chromosome X, voir sur un autosome.

La détermination du sexe gonadique définit la différenciation du testicule à partir de la gonade indifférenciée. La différenciation sexuelle dépend de facteurs génétiques et hormonaux qui participent à la formation de la gonade et à la réalisation d'un phénotype sexuel.

La différenciation gonadique se caractérise par la mise en place du dimorphisme gonadique. Il s'agit de processus qui interviennent dans la détermination puis dans la différenciation de la gonade primaire fœtale bipotentielle en testicule ou en ovaire.

Les processus hormonaux, qui en résultent, participent aussi au développement des canaux de Müller et de Wolff. La différenciation phénotypique mâle se réalise sous l'influence de la production hormonale par le testicule fœtal : la testostérone et l'hormone antimullerienne (AMH). La testostérone est responsable de la masculinisation du canal de Wolff, mais aussi de l'évolution d'autres glandes comme la prostate alors que l'AMH permet la régression des canaux de Müller.

La différenciation des tractus génitaux et des organes génitaux externes établit le sexe phénotypique. Il s'agit de la dernière étape de la différenciation sexuelle et l'orientation vers le phénotype mâle est sous la dépendance des androgènes.

Chez les mammifères, les expériences réalisées par le Pr. A. Jost ont montré le rôle dominant du testicule dans la différenciation sexuelle. Il s'est avéré que la différenciation du tractus génital mâle est provoquée par la production par le testicule fœtal de 2 hormones :

- la testostérone, un stéroïde, produit par les cellules de Leydig, qui maintient les canaux de Wolff. Une fois métabolisée en dihydrotestostérone, elle provoque la masculinisation des organes génitaux externes.
- l'AMH, produite par les cellules de Sertoli, provoque la régression des canaux de Müller qui donnent naissance, chez la femme, aux trompes, à l'utérus et à une partie du vagin (Jost, 1991[46]).

1.2.1. Le rôle de SRY / Sry dans le déterminisme sexuel

L'intérêt sera porté sur les facteurs génétiques responsables de l'engagement de la crête génitale encore indifférenciée dans la différenciation.

Chez l'homme, le chromosome Y porte un gène induisant la détermination testiculaire. L'identification du ou des gènes responsables du déterminisme du sexe impliquant le développement testiculaire a été réalisée par fractionnement d'un fragment de 35 kilobases (kb) du chromosome Y en sous fragments de 2,1 kb (Berta *et al*, 1990 [5] ; Sinclair *et al*, 1990 [114]). Le séquençage de ce fragment se caractérise par la présence d'une phase ouverte de lecture de 669 paires de bases. Celle-ci code pour une protéine du groupe des HMG (High Mobility Group proteins) qui contient un domaine de liaison à l'ADN (Figure 11 ; Vilain *et al*, 1992 [129] ; Barbaux *et al*, 1995 [4]).

Le gène correspondant a été nommé SRY (Sex determining Region, Y chromosome) chez l'homme. Son équivalent murin a été cloné et séquencé, et nommé Sry. Il est soumis à deux types de régulation, temporelle et spatiale : chez la souris, Sry s'exprime au moment de l'organogenèse testiculaire, puis chez l'adulte. Ceci a été confirmé grâce à des expériences montrant que l'ARNm (Acide Ribonucléique messager) de Sry était spécifiquement présent dans le testicule en formation et à l'âge adulte (Koopman *et al*, 1990 [53]). Son expression l'est aussi au niveau du testicule humain.

Sry est considéré comme le testis determining gene chez l'embryon de souris (Koopman *et al*, 1991 [54]) et ce gène est exprimé à 10,5 et 11,5 jours dans les cellules somatiques de la crête génitale (Koopman *et al*, 1990 [53]). Des expériences de culture cellulaire ont montré, à partir de 11,5 jours, que le contrôle de la différenciation sexuelle chez la Souris est une propriété inhérente de la crête génitale (McLaren and Buehr, 1990 [71]). Par ailleurs, des expériences ont permis de montrer que ce gène était exprimé au moment de la différenciation testiculaire à 11,5 jours chez la Souris (Gubbay *et al*, 1990 [40]). La preuve selon laquelle la séquence Sry correspond au seul gène Y spécifique requis pour la détermination testiculaire provient d'expériences de transgénèse. L'introduction d'un fragment génomique de 14 kb contenant Sry, dans le génome d'une souris XX a induit le développement d'une souris phénotypiquement mâle mais stérile (Koopman *et al*, 1991 [54]). Le séquençage complet du transgène n'a révélé la présence d'aucun autre gène que Sry, prouvant ainsi que Sry était nécessaire et suffisant pour induire la détermination testiculaire, en l'absence de toute autre séquence du chromosome Y. Mais la capacité de liaison de l'ADN classe Sry dans la catégorie des facteurs de transcription et suggère l'existence d'autres gènes impliqués dans la cascade de différenciation du testicule en aval du gène Sry, et régulés par le produit de Sry.

Le testicule est composé de plusieurs types de cellules : les cellules de Sertoli (cellules de soutien), les cellules de Leydig (stéroïdogénèse), les cellules myoïdes et interstitielles et les cellules germinales. Les cellules de Sertoli sont les premières à se différencier au sein de la crête génitale.

Des études réalisées sur des souris chimères XX/XY ont montré qu'une grande partie des cellules de Sertoli était XY alors que dans les autres types cellulaires du testicule, le rapport de cellules XX/XY était le même que dans les autres tissus. Ceci suggère que l'action de Sry s'effectue de manière autonome, probablement dans les cellules de soutien, pré-Sertoliennes (Burgoyne *et al*, 1988 [11]). Par contre, d'autres

expériences jettent un doute sur l'hypothèse d'expressions cellulaires autonomes de Sry. Tout d'abord, quelques cellules de Sertoli ont été découvertes avec un caryotype XX (Palmer and Burgoyne, 1991a [88]). De plus, des cellules XY s'étaient différenciées en cellules folliculaires et non en cellules de Sertoli (Palmer and Burgoyne, 1991b [89]). Il est donc fort probable que si Sry a une action cellulaire autonome, il pourrait aussi agir par l'intermédiaire d'une substance diffusible afin de recruter les cellules XX pour qu'elles deviennent sertoliennes. La cellule de Sertoli jouerait un rôle dans l'initiation de certains signaux qui conduise à l'organogenèse du testicule et il suffit que 25% des cellules de soutien exprime Sry pour qu'une gonade indifférenciée s'engage vers un développement testiculaire. D'une part, c'est le seul type cellulaire du testicule qui demande la présence du chromosome Y dans une chimère XX/XY (Burgoyne and Palmer, 1993 [12]). Ces données, en plus des données *in situ* qui localisent l'expression de Sry dans le primordium gonadique à 11,5 jours (Koopman *et al*, 1990 [53]), ont conduit à l'hypothèse que l'expression de Sry est requise seulement dans des cellules pré-Sertoliennes, lesquelles seraient présentes au stade précoce dans le primordium gonadique. D'autre part, les types cellulaires les plus précoces présents dans le primordium gonadique sont encore mal connus, mais certaines recherches confirment bien la présence de cellules pré-Sertoli (Karl and Capel, 1995 [47]).

Toutes ces informations suggèrent que les cellules de Sertoli sont le siège de l'expression du déterminant primaire de la différenciation testiculaire, le produit du gène Sry.

1.2.2. Les gènes nécessaires à la formation des gonades (Barboux *et al*, 1995 [4] ; Schafer and Goodfellow, 1996 [109] ; Morel *et al*, 1997 [83] ; Rey and Josso, 1997 [99])

Deux gènes WT1 et SF-1, ne semblent pas intervenir directement dans le déterminisme sexuel des gonades, mais plutôt dans la mise en place même des ébauches gonadiques. Celles-ci sont nécessaires à l'expression de Sry et ces 2 gènes joueraient un rôle potentiel dans le déterminisme sexuel. De plus, l'activité de ces derniers est essentielle à un développement normal de la gonade et en particulier sa réponse potentielle à Sry.

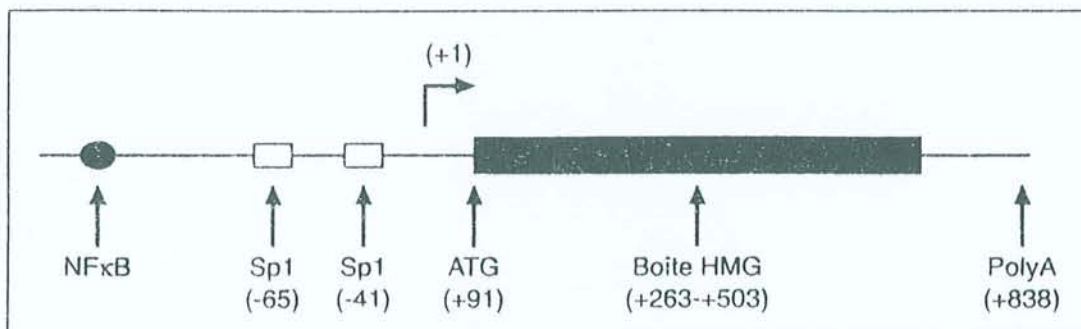


Figure 11 : Schéma de la structure du gène SRY humain (Vilain *et al*, 1992 ; Barbaux *et al*, 1995).

WT1

Le gène WT1 (Wilms' Tumor) a été d'abord isolé comme un oncogène responsable du cancer du rein chez l'enfant présentant le syndrome de WAGR (tumeur de Wilms, Aniridie, anomalies Génito-urinaires et Retard mental). Des mutations ponctuelles ont été trouvées dans le syndrome de Denys-Drash où les patients présentent une tumeur de Wilms associée à une glomérulonéphrite et des anomalies du développement gonadique.

Comme son homologue humain, la protéine WT1 possède une structure particulière en doigts de zinc qui lui permet d'agir comme facteur de transcription. L'expression de ce gène débute, quelque soit la constitution chromosomique XX ou XY, dès le 9^{ème} jour du développement embryonnaire dans la crête génitale et dans le rein en formation.

Les souris transgéniques homozygotes pour une mutation dans WT1 meurent in utero avant le 15^{ème} jour de développement (Kreidberg *et al*, 1993 [55]). Ces souris présentent une absence de reins, des anomalies cardiaques et pulmonaires. L'absence de WT1 n'affecte pas la migration des cellules germinales mais empêche un développement normal de la crête génitale. Ces observations révèlent un rôle indispensable des gènes WT1 au sein du développement rénal et génital.

SF-1

SF-1 (Steroidogenic Factor-1) fait partie de la famille des récepteurs nucléaires. La protéine SF-1 a deux doigts de zinc et un domaine de liaison C-terminale. Alors que sa partie N-terminale diffère des autres récepteurs nucléaires. Son ligand n'est pas encore connu. Chez la souris, les premiers transcrits sont détectés au 9^{ème} jour de développement dans la crête génitale (Ikeda *et al*, 1993 [42]). L'expression est stable dans le testicule au niveau des cellules de Sertoli et de Leydig au cours du développement embryonnaire. La présence de sites de fixation de SF-1 sur tous les promoteurs de gènes codant pour les cytochromes P450 stéroïdogéniques suggère que SF-1 interviendrait dans la régulation de la stéroïdogénèse. La protéine SF-1 régule les enzymes de la stéroïdogénèse en se liant dans leur portion régulatrice au motif AGGTCA comme un monomère.

Les souris qui n'expriment pas SF-1, ne développent ni glandes surrénales, ni gonades et meurent peu après la naissance d'une insuffisance surrénalienne. Cette agénésie gonadique et l'absence de production d'hormones sexuelles entraînent un développement féminin quel que soit le sexe chromosomique. Au 12^{ème} jour, les cellules

de la crête génitale subissent l'apoptose et disparaissent. L'absence de SF-1 ne semble pas affecter la migration des cellules germinales mais celles-ci dégènèrent car elles ne trouvent pas les structures nécessaires à leur développement. Ces résultats suggèrent que cette protéine joue un rôle fondamental dans la différenciation gonadique, dans le développement des gonades et des glandes surrénales.

SOX-9

Les gènes SOX ou SRY-like HMG-box sont caractérisés par l'ADNc et codent pour une protéine du groupe HMG avec un domaine de liaison. La plupart des gènes SOX connus est hautement conservée. Certains gènes interviennent comme facteurs de transcription dans différents mécanismes du développement. Au moins un de ces gènes SOX est impliqué dans la détermination du sexe. Il a été découvert que les mutations à l'état hétérozygote du gène SOX-9, localisé sur la partie distale du bras long du chromosome 17, sont associées à des malformations osseuses dans le Syndrome campomélique et confèrent une inversion sexuelle chez les individus XY. Des expériences d'hybridation in situ ont révélées une expression de SOX-9 au cours de la chondrogenèse d'embryons humains de 7 semaines et au niveau du rete testis et des tubules séminifères d'un fœtus humain mâle de 18 semaines (Wagner *et al*, 1994 [130]). Chez la souris, Sox-9 interviendrait aussi au cours de la chondrogenèse et du développement gonadique (Schafer and Goodfellow, 1996 [109]). Sox-9 s'exprime dans la crête génitale d'embryons XX et XY de 10,5 jours. Cela correspond à la période où l'expression de Sry vient seulement d'être activée chez les embryons XY. Bien que l'expression du gène Sox-9 soit mise en évidence au niveau du cartilage en développement et du tube neural, elle est absente du mésonéphros. De plus, à 11,5 jours, l'expression de Sox-9 est très abondante dans les crêtes génitales d'embryons XY mais totalement absente des embryons XX. Contrairement à Sry qui diminue rapidement, Sox-9 apparaît comme un facteur de différenciation des cellules de Sertoli (Morais da Silva *et al*, 1996 [82] ; Kent *et al*, 1996 [51]). Chez les mammifères, l'expression de SOX-9 pourrait être régulée par SRY au travers d'un gène suppresseur, peut-être DAX-1 ou SOX-3 et par là intervenir dans la régulation de la production d'AMH (Figure 12 ; Graves, 1997 [36]). Graves émet l'hypothèse que la détermination du sexe est contrôlée par l'interaction des gènes SRY et SOX. Le produit du gène SOX-9 autosomal est nécessaire pour la détermination testiculaire. Chez les femelles, SOX-9 est inhibé par le

produit du gène SOX-3 situé sur le chromosome X et aucun testicule ne se forme. Chez les mâles, SOX-3 est inhibé par le produit du gène SRY situé sur le chromosome Y, permettant à SOX-9 d'agir sur la détermination testiculaire (Figure 13 ; Graves, 1998 [37]).

DSS

La région Xp21 située sur le chromosome X, contiendrait un gène DSS (Dosage Sensitive Sex reversal) dont le double dosage causerait une transdétermination de sexe des individus XY. Ces femmes 46, XY présentent une dysgénésie gonadique avec un gène SRY normal, montrant que le gène DSS peut s'opposer au rôle joué par SRY.

Le gène DAX-1 a été isolé sur le chromosome X et code pour un récepteur nucléaire dans sa partie C-terminale, alors que sa partie N-terminale contient une séquence de 65-67 acides aminés, répétée 3,5 fois. Cette partie contient plusieurs cystéines et forme des structures en doigt de zinc faisant la liaison avec l'ADN. Des mutations du gène DAX-1 chez deux patients atteints d'une hypoplasie congénitale des surrénales et d'un hypogonadisme hypogonadotrope expliqueraient le rôle de cette protéine dans le développement des surrénales et de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique mais aucun patient ne présente d'anomalies testiculaires ou d'ambiguïtés sexuelles. L'expression simultanée des gènes SF-1 et DAX-1 au moment du développement des crêtes génitales suggèrent qu'ils jouent un rôle important dans la différenciation gonadique. Les connaissances actuelles sont résumées dans la Figure 14.

Les interactions moléculaires de gènes isolés ne sont pas aussi claires. Sry, est-il un activateur ou le répresseur d'un répresseur? Quel est l'implication des gènes SOX-9 et DSS dans la détermination testiculaire? La plupart des gènes intervenant dans la cascade à l'origine de la détermination sexuelle, joue aussi un rôle potentiel dans d'autres processus de développement: WT1 dans la formation du rein, SF-1 dans le développement de la glande surrénale et SOX-9 dans la morphogenèse de l'os. Est-ce un trait particulier des gènes du développement ou est-ce un recrutement des gènes avec une fonction bien établie dans la cascade de la différenciation sexuelle (Schafer and Goodfellow, 1996 [109])?

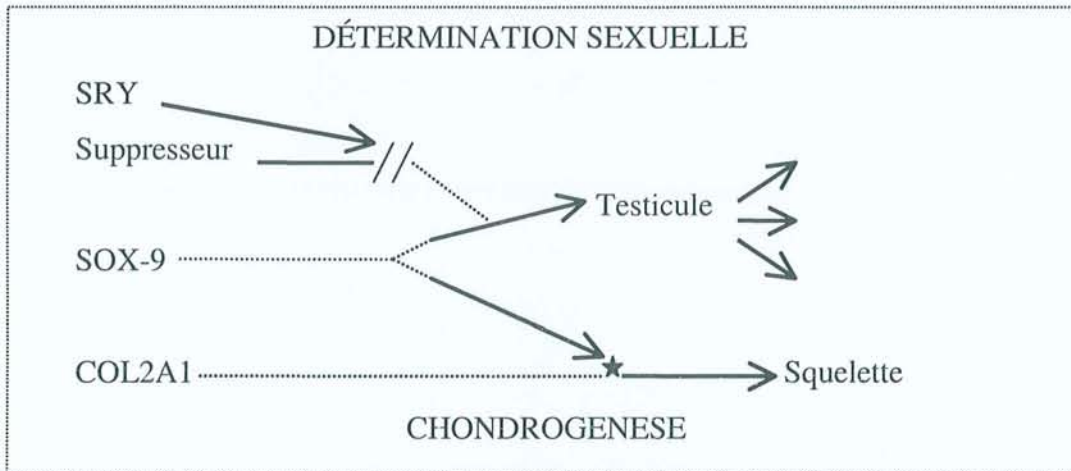


Figure 12 : Modèle d'action de SOX-9 dans la détermination testiculaire et dans la chondrogenèse (Graves, 1997).

(Le gène Col2a1 code pour le collagène de type II, composant structurel du cartilage, // : inhibition, ★ : activation).

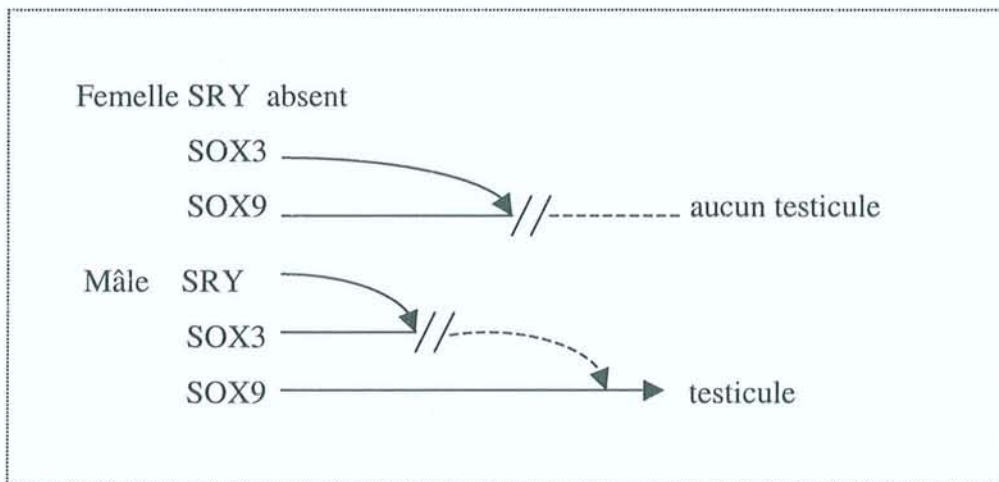


Figure 13 : Hypothèse du contrôle de la détermination du sexe par l'interaction des gènes SRY et SOX (Graves, 1998).

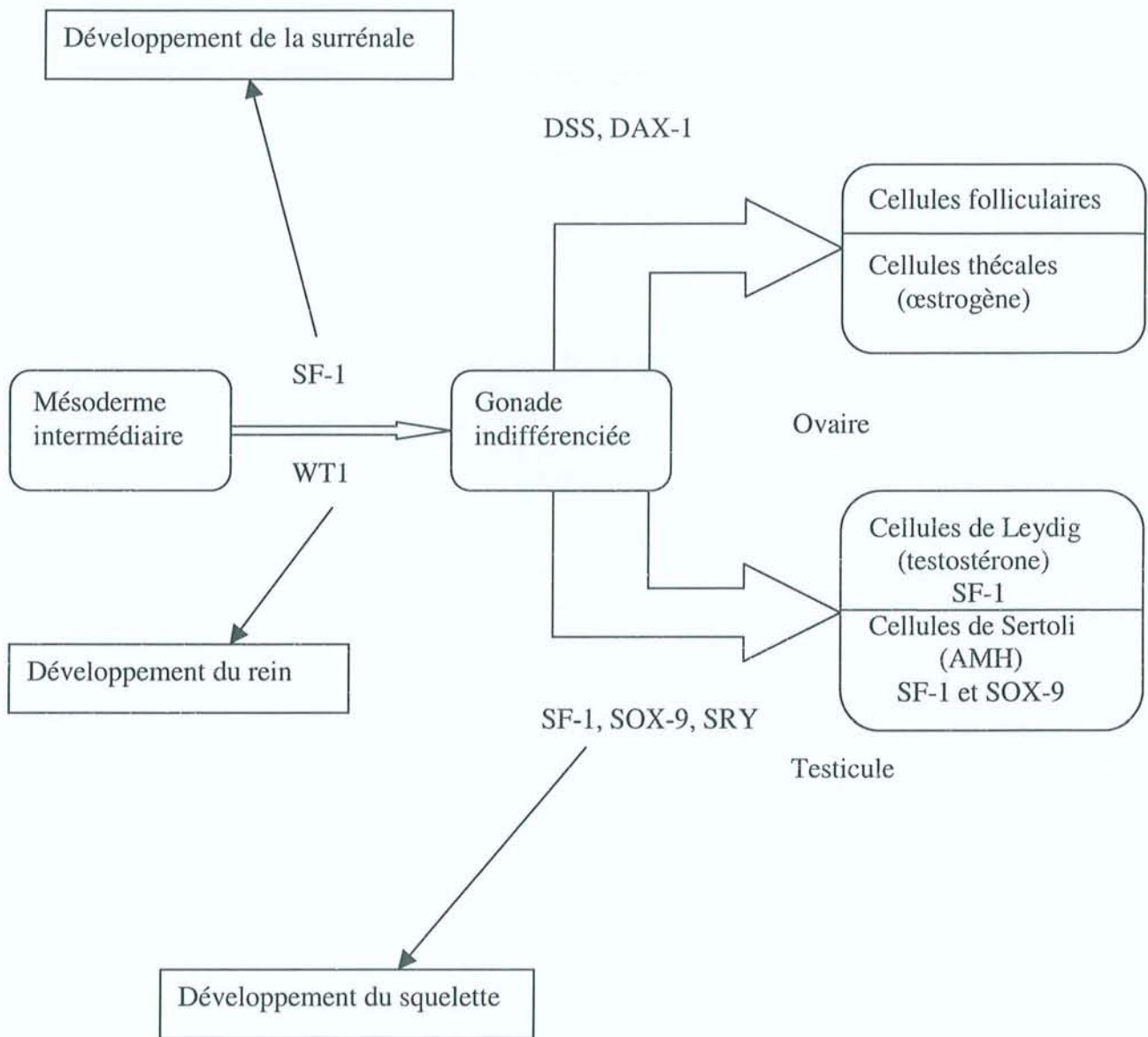


Figure 14 : Situation des gènes impliqués dans la détermination sexuelle chez l'humain (Schafer and Goodfellow, 1996 ; Morel *et al*, 1997).

1.3. Le développement embryonnaire de l'appareil urinaire

Chez les mammifères, le développement de l'appareil urinaire implique trois groupes différents de reins : le **pronéphros**, le **mésonephros** et le **métanéphros** (rein définitif) (Lombard-des-Gouttes, 1983 [60] ; Saxén, 1987 [108]).

1.3.1. Le pronéphros

Chez l'Homme, dès la 3^{ème} semaine, Torrey (1954) décrit des invaginations cœlomiques créant des bourgeonnements compacts, de type néphrotomique, reliés au cœlome par un étroit cordon. Ces provésicules se creusent et constituent une ébauche tubulaire en direction caudale. Il s'en forme jusqu'à 7 paires. Puis, le blastème néphrique s'épaissit ventralement, se condense en un cordon néphrogène et se sépare du mésoderme dorso-latéral où s'ébauche par délamination le canal de Wolff dit « pronéphrique ». Les vésicules cervicales sont des structures vestigiales, non fonctionnelles. Certaines de ces vésicules dégénèrent dans leur totalité et le mésonephros constitue son propre canal collecteur (Pansky, 1986 [90] ; Larsen, 1993 [58]). Pour d'autres auteurs, le canal pronéphritique persisterait et serait utilisé par le mésonephros (Harrison, 1959 [41] ; Wang, 1968 [131] ; Moore, 1974 [80] ; Lombard-des-Gouttes, 1983 [60]). Selon Dubreuil (1947 [21]), la portion supérieure du canal pronéphritique donnerait l'hydatide pédiculée du testicule ou participerait à la formation de la trompe de Fallope.

Chez les rongeurs, seules quelques néphrotomes apparaissent parfois au niveau rostral dans le mésoderme intermédiaire, qui progressivement se condense pour former le blastème néphrique (Brambell, 1928 [9] ; Torrey, 1943 [121]).

1.3.2. Le mésonephros

Chez la Souris (Bovy, 1929 [8]), les premières structures constituées de petits groupes isolés de cellules épithéliales apparaissent au 9^{ème} jour et chez l'Homme (Torrey, 1954 [122]), elles apparaissent progressivement dans la portion médiane du cordon néphrogène au 25^{ème} jour. Chez l'Homme, quand le canal de Wolff atteint le cloaque, 18 à 20 vésicules se répartissent le long du canal. Les premières vésicules, qui

s'abouchent au canal, sont les plus rostrales ; elles se développent en tubules complexes, qui vont dégénérer au fur et à mesure que se différencieront les néphrons les plus distaux. Les néphrons se forment progressivement suivant l'axe rostro-caudal.

Au cours de cette mise en place, une trentaine de paires de néphrons chez l'Homme et une dizaine chez la Souris se répartissent le long du canal. Chez l'embryon humain, à la 10^{ème} semaine, le mésonéphros est parvenu à son développement optimal et, dès le milieu du 3^{ème} mois, les 2/3 rostraux du corps de Wolff ont régressé ; la partie caudale va rapidement se différencier à son tour, avant la fin du 4^{ème} mois (Du Bois, 1969 [20]). Tous les glomérules dégèrent sauf certains tubules : les plus rostraux contribueront à former le ligament suspenseur épigonadique et l'hydatide de Morgani, les tubules intermédiaires participeront à la formation du rete testis et donneront les canalicules épi- et para-didymaires chez le mâle ; chez la femelle, ces tubules sont connectés au hile ovarien qui sera à l'origine de l'épophore, des extensions jusqu'à la médulla et du paroophore. Wang considère le début de la dégénérescence du mésonéphros dans sa portion rostrale : à la fin du 2^{ème} mois de gestation, les 5/6^{ème} des tubules mésonéphritiques dégèrent et se transforment en un ligament suspenseur de la gonade et le 1/6^{ème} restant se différencie. Le processus de régression décrit par Wang (1968 [131]) paraît plus précoce que celui décrit par Du Bois (1969 [20]), mais peut s'expliquer par la variabilité individuelle.

La période de développement du mésonéphros varie du simple au double selon les espèces : le degré de différenciation des corpuscules mésonéphritiques varie de la simple dilatation vésiculaire à la capsule rudimentaire des Muridés. Le mésonéphros de l'Homme occupe une position intermédiaire ; la plupart de ses vésicules se différencie en glomérules vascularisés avec une branche aortique et un plexus capillaire. Chez la Souris, le mésonéphros est particulièrement vestigial et éphémère, il est considéré comme dépourvu de glomérule vasculaire, donc essentiellement non-fonctionnel (Bovy, 1929 [8]). Chez l'embryon de Souris, les étapes évolutives se déroulent très rapidement. Au 12^{ème} jour du développement des portions des trois reins successifs sont présents simultanément (Rugh, 1968 [103]).

1.3.3. Le métanéphros

La formation du rein relève d'une double origine épithélio-mésenchymateuse comportant :

- des éléments collecteurs (uretère, bassinot ou pelvis, calices) et tout le système de canaux et canalicules intraparenchymaire qui dérivent du bourgeon urétéral issu dorsalement du canal de Wolff dans sa partie caudale, un peu au-dessus de son embouchure cloacale,
- des éléments de type glomérulaire et sécréteur qui prennent origine au niveau du blastème rénal, territoire du mésoderme intermédiaire situé postérieurement au mésonéphros, le prolongeant jusqu'à sa partie adjacente au cloaque. Le mésenchyme métanéphrogène constituera les vésicules métanéphriques dont la formation est induite par les extrémités des tubules collecteurs. Ces vésicules croissent rapidement et deviennent des tubules métanéphriques.

L'ébauche première du bourgeon urétéral (qui apparaît chez l'embryon humain de 5 semaines) s'allonge dorsalement, pénètre le mésenchyme puis se renfle en massue. Ce diverticule urétéral se développe ensuite en formant un « T » légèrement dissymétrique et se ramifie. Chaque nouvelle extrémité forme un agrégat de tissu du blastème métanéphrogène donnant 2 lobes vers le milieu de la 6^{ème} semaine. Puis se formerait de 14 à 16 lobes jusqu'à la fin de la 16^{ème} semaine (Larsen, 1993 [58]).

L'ébauche urétérale donnera le canal de l'uretère et les extrémités des ramifications deviendront les futurs tubes collecteurs droits de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} ordre, qui donneront les ampoules. Les générations ultérieures successives donnent des calices majeurs et mineurs, les canaux papillaires et les canaux collecteurs médullaires. Chez l'Homme, une trentaine de générations apparaît.

1.4. Données moléculaires sur le développement embryonnaire du pronéphros, du mésonéphros et du métanéphros (Kumar *et al*, 1997 [57])

RET et GDNF

Au cours du développement, le gène RET est exprimé dans plusieurs territoires embryonnaires, dont le système nerveux et le rein en voie de formation. Le proto-oncogène *c-ret* code pour un récepteur tyrosine kinase (Van der Geer *et al*, 1994 [127]). Des techniques d'hybridation *in situ* et d'hybridation histochimique ont permis de détecter des ARNm *c-ret*, à 8,5 jours embryonnaires dans le néphrotome. Puis, le gène

c-ret s'exprime de 9,0 à 10,5 jours au niveau du canal néphritique, au cours du développement du pro- et du mésonéphros. Le schéma d'expression de c-ret à ce stade suggère que le récepteur ret pourrait jouer un rôle dans la formation du pro- et du mésonéphros. Lors de l'édification du métanéphros, c-ret est exprimé à la surface des cellules épithéliales situées à l'extrémité du bourgeon urétéral de 11,0 à 11,5 jours et au niveau des extrémités des tubes collecteurs rénaux de 13,5 à 17,5 jours (Pachnis *et al*, 1993 [87]).

Des expériences de mutagenèse ciblée ont montré l'absence de système nerveux entérique et de ganglion cervical supérieur, chez des souris homozygotes *ret*^{-/-}. De plus, ces souris présentent des reins rudimentaires ou une agénésie rénale (Schuchardt *et al*, 1994 [111]).

Des expériences récentes de co-cultures de bourgeon urétéral avec du mésenchyme métanéphrique, utilisant *ret*^{K-} ou *ret*^{K+}, démontrent que *ret* est requis dans les cellules du bourgeon urétéral pour la transmission du signal inducteur provenant du blastème. Ces travaux suggèrent que l'hypoplasie rénale est due à des anomalies du bourgeon urétéral (Schuchardt *et al*, 1996 [112]). Le GDNF (Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor), est un facteur neurotrophique. Au cours de l'embryogenèse, le GDNF est exprimé dans les cordons nephrogènes, l'intestin primitif et les poches entobranchiales. Plus tardivement, il est aussi exprimé dans le blastème métanéphrogène, le mésenchyme de l'ensemble du tractus digestif, les bourgeons des membres ainsi que dans certaines régions du cerveau. Plusieurs travaux de mutagenèse ciblée ont montré que 30 à 40% des souris hétérozygotes (*Gdnf*^{+/-}) ont de graves malformations rénales : agénésie et dysplasie. D'autre part, les animaux homozygotes (*Gdnf*^{-/-}) non viables, présentent dans la majorité des cas une agénésie rénale bilatérale liée à une anomalie de développement du bourgeon urétéral (Moore *et al*, 1996 [81] ; Sanchez *et al*, 1996 [107]). La similitude entre le phénotype souris *Gdnf*^{-/-} et *Ret*^{-/-} est étonnante. Ces résultats suggèrent que l'interaction de c-ret, exprimé dans le bourgeon urétéral, avec GDNF, exprimé dans le mésenchyme métanéphritique, est essentielle pour le développement du rein chez la souris (Suvanto *et al*, 1996 [119]).

N-myc

Parmi les IEG (ImmEDIATE-EARLY GENES), la famille des proto-oncogènes *myc* a été suivie au cours du développement métanéphrique (Murgrauer and Ekblom, 1991 [84]).

L'ARNm de c-myc est fortement exprimé à la fois dans le mésenchyme non induit et induit au niveau du cortex central et périphérique du métanéphros d'embryon de souris de 16 jours. Une faible expression de N-myc est localisée sous forme d'îlots éparses en dehors du cortex alors que L-myc est principalement exprimé au niveau de l'épithélium des branches du bourgeon urétéral. D'autre part, l'expression du gène N-myc a été suivie par Northern blot sur l'ARN total d'embryons murins de 9,5 à 17,5 jours. Ces analyses montrent une forte expression du gène N-myc à 9,5 jours qui décroît au cours du développement. Puis par hybridation in situ de transcrits, l'expression de N-myc a été détectée au niveau des tubules pronéphritiques et mésonéphritiques (Kato *et al*, 1991 [48]). Ces résultats suggèrent que c-myc est impliqué dans les phases précoces du développement du mésonéphros et du métanéphros. Le rôle biologique de la famille des proto-oncogènes myc dans le développement du rein a été étudié par des expériences de mutagenèse et de recombinaisons homologues. Des animaux homozygotes pour N-myc⁻ ont montré une légère réduction de la morphogenèse des tubules mésonéphritiques (Stanton *et al*, 1992 [117]). Par contre, la mutagenèse ciblée par fusion d'un fragment d'ADN de souris porteuse d'une tumeur mammaire virale MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) avec le proto-oncogène c-myc de souris a engendré des souris transgéniques porteuses d'une mutation récessive MMTV-myc qui développent une aplasie ou hypoplasie rénale uni ou bilatérale avec des malformations des membres (Woychik *et al*, 1985 [141] ; Mass *et al*, 1990 [70]).

Ld

Par ailleurs, les protéines recombinantes du gène *ld* (limb deformity) sont référencées comme formines, dont leur rôle varie suivant le type tissulaire (Woychik *et al*, 1990 [142]). L'expression nucléaire des formines, limitée au pronéphros et au mésonéphros, suggère leur rôle dans les phases précoces du développement rénal. De plus, l'analyse d'embryons *ld/ld*, de 11 à 13 jours, révèle un retard de croissance ou une absence complète du bourgeon urétéral, inducteur du mésenchyme métanéphrique. Ces animaux homozygotes pour la mutation *ld*, présente une agénésie rénale uni ou bilatérale. D'autre part, les transcrits *ld* peuvent être détectés à la fois dans le mésenchyme métanéphrique et dans le bourgeon urétéral, ce qui suggère que la base moléculaire d'une anomalie du développement du bourgeon urétéral pourrait être ce composant (Maas *et al*, 1994 [63]).

Lim

Par ailleurs, l'expression du gène *Lim1*, par hybridation in situ, a été révélée dans les tubules mésonéphritiques d'embryons de souris de 10,5 jours (Fujii *et al*, 1994 [27]).

Pax-2, Pax-8 et WT1

Les transcrits des gènes *Pax-2* et *Pax-8* ont été détectés dans les tubules pro- et mésonéphritiques, puis dans le mésenchyme métanéphritique et dans les tubules induits (Tremblay and Gruss, 1994 [123]). L'intérêt des chercheurs s'est surtout focalisé sur le gène *Pax* à partir de souris *Krd* (Kidney retinal defects) présentant une délétion de *Pax-2* et de souris *Sd* (Danforth's short tail) caractérisée par une mutation spontanée au niveau du locus *Sd* au voisinage du gène *Pax-8*. Dans ces 2 cas, les animaux sont atteints par des anomalies rénales (Gruss and Walther, 1992 [39] ; Keller *et al*, 1994 [50]). D'une part, des souris transgéniques surexprimant *Pax-2* présentaient une désorganisation des structures épithéliales rénales (Dressler *et al*, 1993 [19]). Un autre exemple d'interactions est la répression de la transcription de *Pax-2* par le gène suppresseur *WT1*. Ce dernier se lie à des séquences régulatrices de *Pax-2* (Ryan *et al*, 1995 [104]). *Pax-2* peut être activée par liaison de *EGR-1* (Early Growth Response) à la région promotrice reconnaissant *WT1* ; ce qui suggère que son activité est modulée par *EGR-1* et par *WT1* (Sukhatme *et al*, 1998 [118]). D'autre part, *Pax-8* peut activer le gène *WT1* et son expression (Dehbi and Pelletier, 1996 [16]).

Par ailleurs, chez la souris de 9,5 à 12,5 jours, le gène *w1* est exprimé au niveau du mésonéphros (Armstrong *et al*, 1992 [3]). Ces travaux ont été complétés par d'autres résultats qui confirment la localisation d'ARNm de *WT1* au niveau de tissus pro- et mésonéphritiques dès 10,5 jours (Rackley *et al*, 1993 [95]). Par des expériences de mutagenèse, des souris *WT1^{-/-}* développent pratiquement la totalité des tubules mésonéphritiques rostraux, par contre les tubules mésonéphritiques caudaux sont absents (Sainio *et al*, 1997 [105]). Ces auteurs suggèrent par ces expériences que les tubules rostraux seraient d'origine wolffienne (corps de Wolff), alors que les tubules caudaux auraient pour origine le mésenchyme mésonéphritique. De précédents travaux sur des souris *WT1^{-/-}* suggéraient que le gène *WT1* jouerait un rôle dans les interactions épithélium et mésenchyme métanéphrique du fait de la présence d'agénésie rénale chez

les souris avec des anomalies du développement du bourgeon urétéral (Kreidberg *et al*, 1993 [55]).

L'élucidation des gènes intervenant dans le développement embryonnaire du pro, méso et métanéphros offre la possibilité de mieux comprendre les mécanismes en cause dans les anomalies du développement du rein.

1.5. Le rôle du mésonéphros dans la morphogenèse gonadique

Un marquage commun a été observé au niveau de cellules des tubules mésonéphritiques et des cellules colonisant la gonade, suggérant que les cellules des tubules mésonéphritiques seraient à l'origine des cellules pré-Sertoli (Merchant-Larios, 1979 [73] ; Upadhyay *et al*, 1979 [125] ; Zamboni and Upadhyay, 1982 [143]). Bien que la contribution mésonéphritique aux cellules pré-Sertoli présentes dans la gonade reste controversée (Wartenberg *et al*, 1991 [135]), des expériences de cultures cellulaires chez la souris ont montré que quelques cellules du stroma (les cellules myoïdes et les cellules fibroblastiques) avaient une origine mésonéphritique (Buehr *et al*, 1993 [10]). Ces cellules en provenance du mésonéphros se déplaceraient vers la gonade et participeraient à la formation des cordons. De plus, si le mésonéphros et la gonade sont séparés par une membrane imperméable, la formation de cordons ne se produit pas (Buehr *et al*, 1993 [10] ; Merchant-Larios *et al*, 1993 [74]).

Par ailleurs, chez la souris, des coupes confocales ont révélé 3 à 6 connexions cellulaires entre les tubules mésonéphritiques et le primordium gonadique à 11,5 jours embryonnaires. Pour ces auteurs, comme les ponts cellulaires sont présents au niveau des gonades mâles et femelles, ils en concluent que leur organisation ne serait donc pas dépendante de l'expression du gène Sry (Karl and Capel, 1995 [47]).

1.6. Données sur les connaissances structurelles du mésonéphros

Chez l'Homme, les seules reconstructions précises du mésonéphros avec ses tubules mésonéphritiques ont été réalisées par la méthode de représentation graphique sur les 12 premières semaines de développement d'embryons de 3,5 mm à 36 mm (Figures 1 à 3 ; Mac Callum, 1902 [64]; Shikunami, 1926 [113] ; Altschule, 1930 [1]). La représentation schématique de l'appareil urinaire d'un embryon humain de 3,5 mm, révèle dans le sens rostro-caudal la présence d'une masse cellulaire, tubulaire et fine, puis un autre segment

cellulaire d'où émergent de petites masses arrondies et plus caudalement, le segment présente de petites masses d'où commencent à se dégager de petites tubules. Dans cette représentation, aucun glomérule n'est visible (Figure 1a ; Mac Callum, 1902 [64]). Les 3 projections géométriques détaillées des mésonéphros d'embryons humains de 5,5 mm, 8 mm et 14,6 mm révèlent la présence, respectivement, de 40, 38 et 39 tubules. La représentation de 5,5 mm montre que la plupart des tubules ont une forme en S et seuls les plus caudaux sont isolés du canal de Wolff. Dans le mésonéphros de 8 mm, à l'exception du premier tubule, les 37 autres tubules prennent la forme d'un S. Les tubules 19 et 20 sont liés au canal de Wolff en un même point d'origine. Cette bifurcation se produit aussi au niveau des tubules 34 et 35, ainsi que 37 et 38. Dans la dernière représentation, les plus rostraux sont atrétiques et quelques tubules sont convolutés (Figures 1b, 2a et 2b ; Shikunami, 1926 [113]). Les Figures 3a et 3b représentatives des embryons humains de 31 et 36 mm de longueur ne présentent qu'une dizaine de tubules parmi la trentaine composant le mésonéphros (Altschule, 1930 [1]).

Chez la souris, par la même méthode, ce sont les travaux de Jeanne Bovy (1929 ; [8]) qui ont permis de suivre le développement simultané du corps de Wolff, de la crête génitale et de leurs connexions réciproques. A 9 jours, il existe « un canal de Wolff complètement formé ; 7 à 8 ébauches canaliculaires sont encore rudimentaires et la plupart d'entre elles étant confondues en une masse commune ». A 10,5 jours, « les canalicules Wolffiens sont bien différenciés à l'extrémité céphalique et s'échelonnent régulièrement. En général, trois de ces canalicules débouchent successivement dans le canal de Wolff, après un trajet assez court et légèrement sinueux ». « Au total, on compte en moyenne 10 à 13 lumières, réparties sur toute la longueur de la traînée de condensation ; elles sont plus rapprochées et plus nombreuses dans le tiers antérieur du corps de Wolff » (Figure 4a). L'auteur décrit, à 11,5 jours, l'existence de certains tubules comme étant des « canalicules abortifs qui n'aboutissent jamais au canal de Wolff », qui s'allongent et deviennent flexueux. Par contre, il a été décelé dans quelques rares canalicules abortifs, la présence de dilatation ampullaire (Figure 4b). A 12 jours, les traits majeurs portent sur l'épaisseur de l'ébauche gonadique et sur la longueur des canalicules (Figure 4c). A 13 jours, l'auteur constate que « la disposition des cordons cellulaires de première prolifération » est plus diffuse dans le mésonéphros d'un embryon femelle que mâle (Figures 4d et 4e). Ces cordons résultent du

« bourgeonnement de l'épithélium canaliculaire. Ce sont des trainées cellulaires qui se dirigent vers la partie la plus externe du mésonéphros, pour se mettre en rapport avec les formations épithéliales de la glande génitale ». De plus, la comparaison de ce stade au stade précédent révèle une réduction frappante de la longueur des canalicules wolffiens (Figure 4d). A partir du mésonéphros de l'embryon mâle de 13,5 jours, il a été constaté que «de l'extrémité distale des canalicules ou du premier abortif, partent les prolongements, ébauche du rete. Ils sont plus épais que dans le stade précédent, mais toujours bien individualisés les uns des autres» (Figure 4e). A 14,5 jours, apparaît un « véritable hile par lequel pénètrent les vaisseaux et les cordons du rete », par contre, seuls 2 vestiges de canalicules wolffiens persistent et débouchent dans le canal collecteur. Pour l'auteur, « les canalicules abortifs ne se distinguent plus guère des vestiges des autres canalicules » (Figure 4f). Dans un embryon mâle de 15 jours, l'auteur décrit un affaissement du pôle céphalique du corps de Wolff qui serait à l'origine du rapprochement les uns des autres des points d'abouchements des canalicules, tandis que le canal de Müller et les canalicules abortifs commencent à dégénérer. Par ailleurs, elle a montré «que la Souris rentre dans la catégorie des espèces où les connexions uro-génitales sont de nature wolffienne» et fait remarquer la constance dans le nombre de canalicules : «les trois antérieures se mettent à 10,5 jours en relation constante avec le canal collecteur ; les autres formations, au nombre définitif de 3, 4 ou 5, auxquelles nous avons donné le nom d'ébauches abortives, ne se rattachant jamais au canal». De plus, «le rete est de provenance canaliculaire et non glomérulaire» (Figure 4 ; Bovy, 1929 [8]).

Récemment, un mésonéphros d'un embryon humain de 5 semaines a été reconstruit, au moyen de l'outil informatique, mais seulement sous la forme d'une bandelette sans considérer les tubules mésonéphritiques. L'avantage de cette reconstruction est de permettre de situer la région mésonéphritique dans son contexte (Figure 5 ; Machin *et al*, 1996 [65]).

Le caractère partiel et limité des données de la littérature permet de justifier une reconstruction plus précise du mésonéphros humain et murin.

1.7. La reconstruction tridimensionnelle en biologie à partir de coupes histologiques sériées

La reconstruction à partir de coupes histologiques sériées est une méthode qui permet de créer les différents éléments constitutifs d'un objet et de rétablir leur forme afin de comprendre l'organisation de ses éléments. Cette conception se distingue des méthodes d'observation microscopique par les deux points suivants :

- fournir des vues bidimensionnelles dans un angle identique ou différent de l'observation offrant une première approche de l'objet étudié,
- et plus généralement, obtenir des représentations tridimensionnelles soit par des techniques de reconstruction (superposition, moulage,...), soit par la reconstruction 3D d'un objet à l'aide de l'outil informatique (Ware and LoPresti, 1975 [132] ; Gaunt and Gaunt, 1978 [29]).

Cette dernière méthode offre des perspectives plus intéressantes (découpage quelconque, lissage et coloration de surface particulière...) et c'est celle-ci que sera utilisée.

1.7.1. La reconstruction d'objets biologiques : approche « historique » (Udupa, 1991 [124])

La reconstruction débute par la « représentation graphique » sous deux modalités de reproduction qui sont la technique du dessin et la prise de clichés photographiques. Ces deux procédés confèrent à la reconstruction une impression de relief. La reconstruction graphique permet d'effectuer des mesures, mais elle ne constitue pas une vraie représentation dans les trois directions de l'espace. La « reconstruction projective » de His (1887) fournit une image en deux dimensions dans un plan perpendiculaire à celui de la coupe de l'objet. Les reconstructions de ce type peuvent être obtenues soit en confectionnant une série de dessins, soit à l'aide de clichés photographiques. Les différentes étapes du procédé peuvent donner une idée de la configuration spatiale de l'organe, mais la reconstruction résultante est inexploitable pour une vraie étude quantitative.

La technique « d'isolement graphique » est basée sur la superposition de dessins exécutés sur papiers transparents ou sur plaques de verre. Ce procédé est amélioré par Kastschenko (1888) et par Lebedkin (1926).

La « reconstruction graphique perspective » présente l'avantage d'aboutir à une représentation de l'objet vu sous un angle quelconque (Odhner, 1910 ; Dubreuil, 1921 ; Peter, 1922 ; Lison, 1936). Lison admet les limites de cette reconstruction dès l'apparition d'une certaine complexité de résolution de structures pluritubulaires et contournées. Seule la « reconstruction plastique » peut approcher le réalisme de la dissection quand celle-ci est impossible (Gaunt and Gaunt, 1978 [29]). Elle fournit une véritable reproduction tridimensionnelle de la totalité de l'objet débité ou de certaines portions de l'objet. La « reconstruction plastique » a été mise au point par Born en 1900 ; son principe n'a guère changé si ce n'est dans la matière première utilisée pour la reconstruction. La technique consiste à reporter par calques les dessins des coupes sériées sur les plaques d'un matériau convenablement choisi. Puis, il s'agit de découper les parties à reconstruire et de les superposer en suivant leurs repères. L'épaisseur des plaques est adaptée à celle des coupes selon le grossissement utilisé. L'ensemble des plaques superposées donne une reconstruction plastique de l'objet étudié. Au début, les plaques étaient moulées à la cire, puis avec un mélange de cire, de paraffine et de résine de pin (Wilson, 1915). Le type de matériau a évolué de la simple plaque de carton à celle de plâtre puis de mousse de plastique. La reconstruction tridimensionnelle la plus spectaculaire est celle que Sjöstrand a réalisé à partir de coupes fines et sériées de microscopie électronique pour la rétine de lapin. La reconstruction obtenue remplit une pièce complète avec seulement 89 coupes sériées et permet de visualiser un réseau neuronal avec toutes ses connexions (Sjöstrand, 1974 [115] ; 1989 [116]).

Il paraissait nécessaire de situer les prémices de la reconstruction d'objets biologiques afin de mieux se rendre compte de l'apport des progrès technologiques. Dans le développement technologique, l'apparition de la numérisation et l'avancée de la programmation informatique ont contribué au développement de la reconstruction tridimensionnelle. Les points fondamentaux d'une reconstruction 3D sont, tout d'abord, exposés à l'aide des outils informatiques.

1.7.2. La reconstruction d'objets biologiques : approche « informatique »

L'ensemble des étapes du cheminement vers la reconstruction 3D comprend : la modélisation et la visualisation.

1.7.2.1. La modélisation

La reconstruction d'un objet 3D à partir d'images 2D est possible grâce à l'idée de la segmentation des contours en lignes polygonales et à celle de la triangulation. La reconstruction envisagée au cours de cette étude est basée sur un des 3 types de modèles utilisés en 3D.

1.7.2.1.1. Les différents modèles

1.7.2.1.1.1. Fil de fer

La représentation la plus simple d'un cube est celle donnée par le modèle dénommé « fil de fer » ou « wire frame ». Dans ce cas, l'objet est un cube à 12 arêtes et 8 sommets. Il est caractérisé par ses 8 sommets (1 à 8) et ses 12 arêtes (1-2, 2-3, 3-4,...) mais par simple observation, rien ne permet d'affirmer que telle partie du cube est en premier plan et que telle autre est en arrière-plan, même si la forme globale de l'objet reste bien un cube (Figure 15). L'inconvénient de ce modèle est de n'apporter aucune information quand à l'orientation de l'objet et de permettre plusieurs interprétations.

En outre, ce modèle en fil de fer offre uniquement la possibilité d'effectuer des calculs de longueur.

1.7.2.1.1.2. Surfactive

En gardant le modèle d'un cube, sa représentation se définit là aussi par ses 12 arêtes et ses 8 sommets comme dans le modèle précédent, mais, en plus, les 6 faces de cette structure géométrique sont identifiées par les sommets constitutifs d'une face (1-2-3-4, 1-2-8-5, 1-4-6-5, 7-8-2-3, 7-8-5-6, 7-6-4-3) (Figure 16).

Ici, le modèle surfactive permet de calculer les surfaces en plus des longueurs.

1.7.2.1.1.3. Volumique

Le modèle volumique d'un cube conserve toujours ses caractéristiques géométriques. Il est considéré comme une portion de l'espace définie, par exemple, par un ensemble de 5 tétraèdres adjacents dans l'espace (1-2-4-5, 2-3-4-7, 5-7-8-2, 5-7-6-4, 5-7-2-4) (Figure 17).

Le modèle géométrique obtenu peut faire l'objet de calculs de données numériques comme les longueurs, les surfaces et les volumes.

1.7.2.1.2. La réalisation

Dans le cas du modèle surfacique employé dans cette étude, deux étapes préliminaires, de segmentation et de triangulation, sont nécessaires pour créer un modèle 3D de l'objet.

1.7.2.1.2.1. La segmentation

Il s'agit de mettre en évidence les frontières des différentes structures par l'extraction des contours de chacun des plans de coupe de l'objet à reconstruire. La phase de segmentation dépend d'une valeur seuil (Prewitt et Mendelshon, 1966 [94]). Seuls sont retenus les pixels de la coupe dont la densité est supérieure à une valeur seuil, ou comprise dans une zone de valeurs. Une autre technique conduisant aussi à une segmentation consiste à détecter les zones ayant une discontinuité brutale de la densité.

En comparant la densité d'un pixel à celle de ses plus proches voisins, le pixel retenu est celui dont la différence est supérieure à une valeur seuil, et ce pixel est considéré comme un point constitutif du contour de l'objet. Cette détection de contours, basée sur le calcul d'une variation de densité, encore appelée gradient, donne les coordonnées x et y des pixels retenus. Ces différentes méthodes sont issues des travaux réalisés dans le cadre du traitement d'images.

1.7.2.1.2.2. La triangulation

Keppel (1975) [52] et Fuchs (1977) [26] proposent de construire une surface grâce à un ensemble de facettes triangulaires entre les contours détectés à l'étape précédente et approchés par des polygones à partir desquels, un graphe est construit (Figure 18).

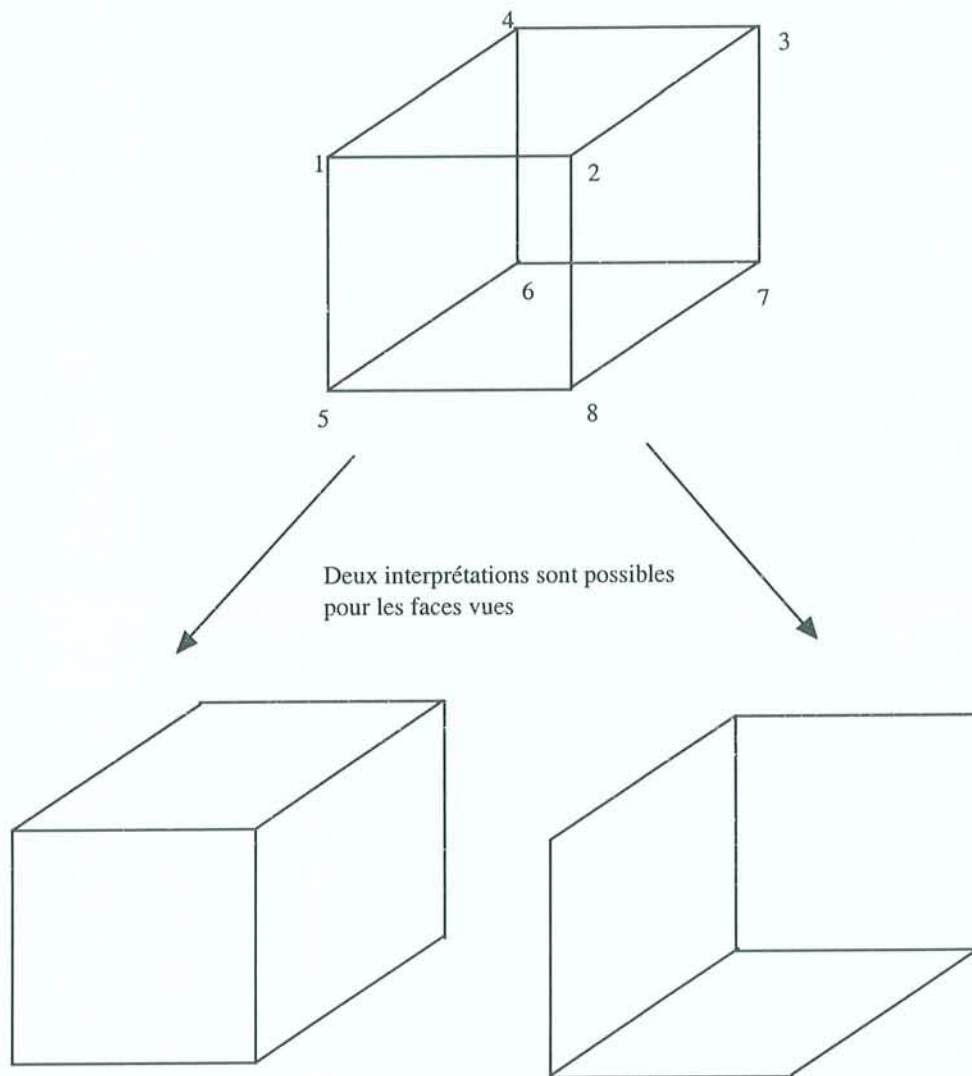


Figure 15 : Modèle en fil de fer d'un cube à l'aide de 12 arêtes: (1-2, 2-3, 3-4,...) et de 8 sommets.

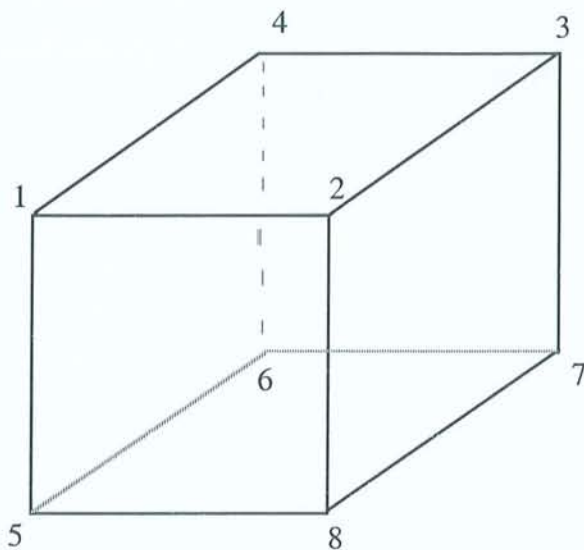


Figure 16: Modèle surfacique d'un cube à l'aide de 6 faces: (1-2-3-4, 4-3-7-6, 6-7-8-5, 5-8-2-1, 8-7-3-2, 1-4-6-5) et 12 arêtes et 8 sommets

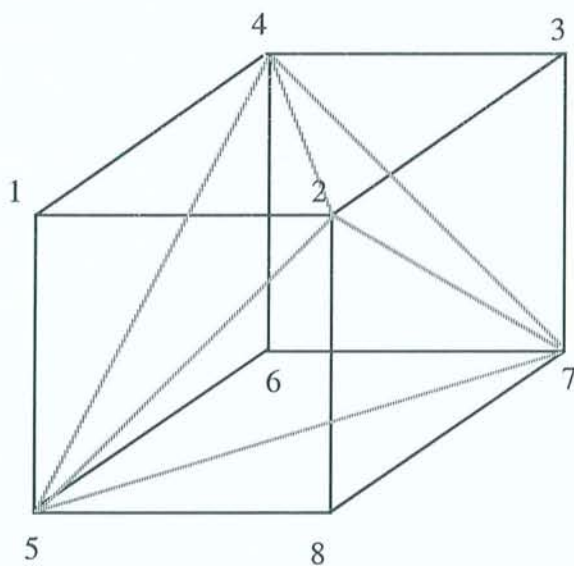


Figure 17 : Modèle volumique d'un cube à l'aide de 5 tétraèdres: (1-2-4-5, 2-3-4-7, 5-7-8-2, 5-7-6-4, 5-7-2-4) et des précédentes caractéristiques.

Soient les points $A(i)$ du contour $C(k)$, $B(j)$ du contour $C(k+1)$ et un triangle formé $(B(j-1), B(j), A(i))$, pour créer le triangle suivant, deux possibilités sont offertes :

soit en connectant les points $B(j)$ et $A(i+1)$ pour créer le triangle $(A(i), B(j), A(i+1))$,
soit en connectant les points $A(i)$ et $B(j+1)$ pour créer le triangle $(A(i), B(j), B(j+1))$.

Le choix de la connexion à réaliser se fait en privilégiant un des critères suivants :

- minimiser la longueur des arêtes des triangles,
- minimiser la surface du polyèdre formé par les triangles (Fuchs *et al*, 1977 [26]),
- maximiser le volume du polyèdre composé par tous les triangles dans le cas d'un objet concave ; et minimiser ce volume dans le cas d'un objet convexe (Keppel, 1975 [52]).

En affectant à chaque arête un poids correspondant à l'aire de la facette qu'elle constitue, la surface d'aire minimale est obtenue dans ce graphe en recherchant le plus court chemin.

Le choix de ce critère peut générer des surfaces peu naturelles et, pour pallier à cette déformation, il suffit de modifier le poids affecté aux arêtes (Keppel, 1975 [52]). Cette méthode de triangulation est largement utilisée dans la pratique, malheureusement, elle échoue souvent lorsqu'il apparaît, entre deux coupes successives, de trop grandes dissimilarités.

Shantz (1981) [110] a envisagé des modifications des algorithmes pour traiter les ruptures topologiques comme les embranchements et les trous dans les objets.

1.7.2.2. La visualisation

1.7.2.2.1. La face cachée

L'intérêt majeur de la modélisation polygonale d'un objet est la variété des outils disponibles et de leurs performances pour la visualiser. En synthèse d'images, l'objectif est d'obtenir le meilleur rendu possible. Il s'agit de convertir les coordonnées de l'objet en coordonnées écran pour générer des images.

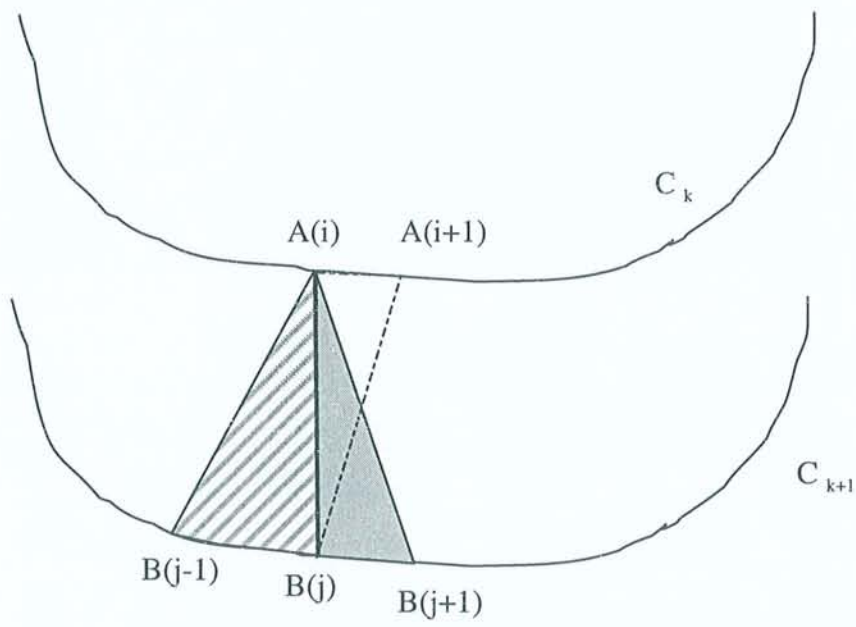


Figure 18 : Triangulation entre deux coupes successives.

Ces opérations élémentaires passent par des transformations géométriques et par une projection parallèle ou perspective de l'objet sur l'écran. La séquence permettant d'obtenir une image réaliste comprend une élimination des parties cachées et un éclairage de la scène (Figure 19).

Parmi les algorithmes d'élimination des parties cachées, l'intérêt s'est porté plus particulièrement sur deux groupes, celui de type lancer de rayon (ray tracing ou ray casting) et celui de type Z-buffer.

La première méthode privilégie la qualité de l'image et se limite par le fait que plus un objet est éloigné, plus il a de chance d'être masqué par un objet plus proche. Le choix des polygones à afficher dépend de la distance géométrique séparant la scène de l'écran.

La seconde méthode privilégie la rapidité car elle est plus performante en temps de calcul (Goret, 1990 [34]). Le principe est fondé sur l'algorithme du Z-buffer ou « mémoire avec tri de profondeur ». Il s'agit d'un algorithme mis au point par Catmull (1974) [14], qui utilise une mémoire auxiliaire (mémoire-tampon Z ou Z-buffer) pour un stockage de la profondeur (coordonnée selon l'axe Z) de la facette projetée sur le pixel étudié.

1.7.2.2.2. La visualisation

La technique du « Z-buffer » présente de nombreux avantages : une simplicité de conception, une grande précision et un temps de calcul qui évoluent linéairement avec la complexité de la scène. Par contre, le stockage des données est une contrainte non négligeable.

D'autre part les problèmes d'aliassage sur les images ne sont pas entièrement résolus. L'aliassage est le phénomène de crénelage qui apparaît le long des contours des objets.

En même temps que l'élimination des parties cachées est faite, l'illumination de la scène se réalise. Elle procède à l'affectation d'une intensité et d'une couleur à chaque pixel. La couleur du pixel dépend de la couleur de la face associée à ce pixel, l'intensité, elle, dépend de l'éclairage reçu par la face.

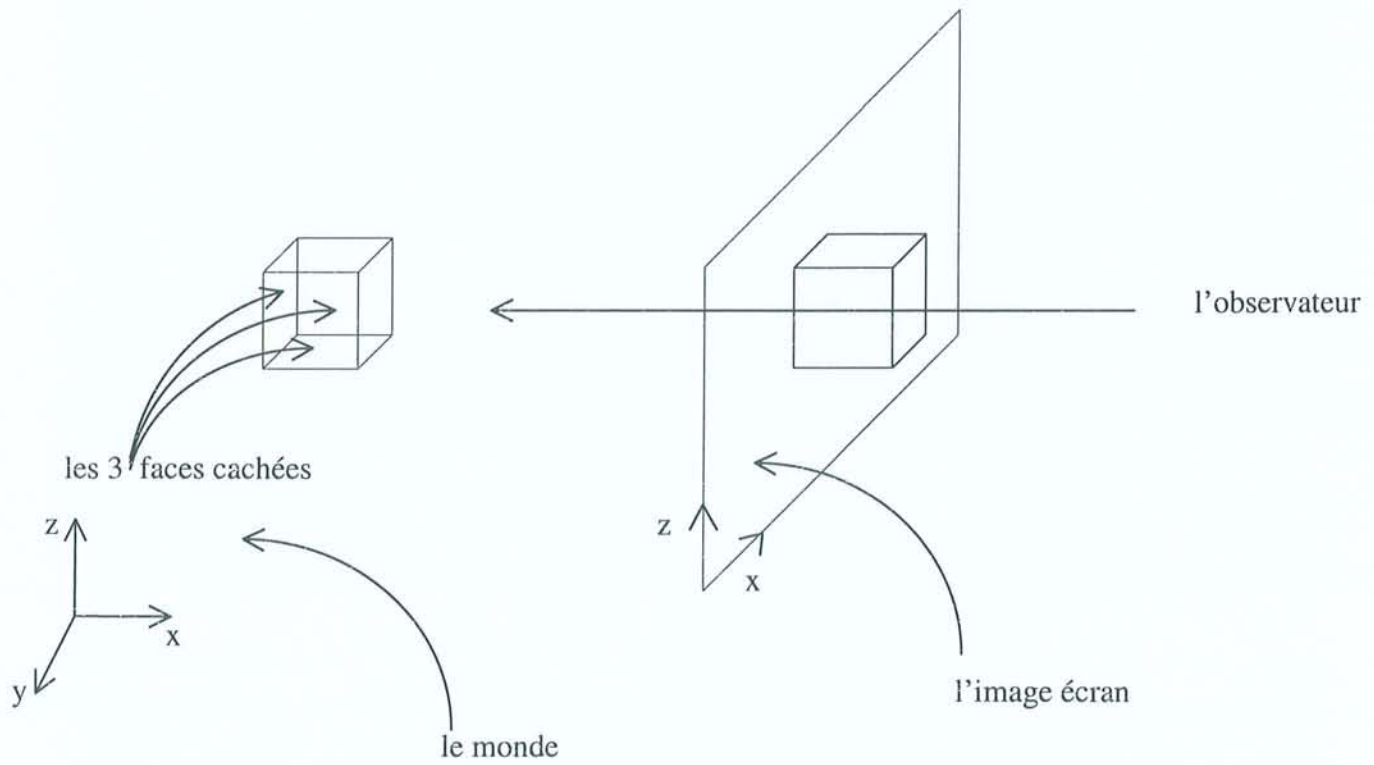


Figure 19 : Représentation d'un cube avec élimination des faces cachées.

Les modèles d'illumination correspondent à une représentation mathématique du comportement de la lumière en tenant compte de certaines propriétés physiques (Figure 20) :

La distance

L'intensité de la lumière émise par un point de la surface de l'objet décroît en fonction du carré de la distance qui sépare ce point du plan de projection.

La réflexion diffuse

L'intensité de la lumière diffuse par un point de la surface de l'objet (elle est indépendante de la direction d'observation), varie en fonction du cosinus de l'angle formé par la direction des rayons lumineux et le vecteur normal à la surface en ce point.

La réflexion spéculaire

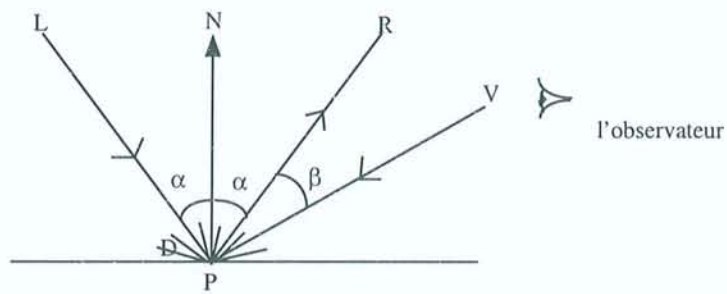
L'intensité de la lumière réfléchi par un point de la surface de l'objet varie en fonction du cosinus de l'angle formé par la direction des rayons lumineux réfléchis et le vecteur de vision.

La transparence

Une fraction de la lumière incidente en un point de la surface est transmise au travers de l'objet selon un indice de réfraction qui est constant pour tous les points d'une même surface.

Le modèle de calcul de l'intensité lumineuse nécessite le calcul du vecteur normal en tout point de la surface à visualiser. En fonction de l'espace (la scène, l'espace objet ou l'espace de visualisation), le vecteur est calculé (Udupa, 1991 [124]).

Pour éviter trop de calcul, il existe deux modèles d'interpolation de l'intensité lumineuse pour le Z-buffer qui sont la méthode de Gouraud (1971) [35] et la méthode de Phong (1975) [93]. Leurs modèles procèdent à un lissage des surfaces qui consiste à estomper l'aspect anguleux présent à la jonction des polygones entre eux.



Géométrie de la réflexion de la lumière

P: point de la surface d'un objet

L : lumière émise

N : vecteur normal

D : direction de la réflexion diffuse

R : direction de la réflexion spéculaire

V : direction d'observation

Figure 20 : Représentation mathématique du comportement de la lumière.

Le lissage de Gouraud consiste à calculer les vecteurs normaux aux sommets des polygones, puis à calculer l'intensité lumineuse aux sommets des polygones, puis l'intensité en chaque pixel est calculée en interpolant linéairement en fonction des valeurs des intensités aux sommets du polygone. Le principal défaut d'un lissage aussi rapide est la génération de « bandes de Mach » : discontinuités liées à la variation d'intensité entre des bandes colorées adjacentes légèrement distinctes.

Le lissage de Phong consiste à calculer les vecteurs normaux aux sommets des polygones, puis à calculer la normale en chaque point de la face par interpolation linéaire des normales calculées aux sommets d'une facette, puis à calculer l'intensité. Cette méthode, qui permet de minimiser les « bandes de Mach » et de préciser les valeurs à l'origine de la réflexion spéculaire, est préférée pour sa qualité d'image mais au détriment d'un temps de calcul plus important.

1.7.3. Les différents modeleurs utilisés dans le domaine de la biologie

Des équipes de recherche se sont consacrées à la reconstruction d'objets biologiques 3D à partir de coupes sériées. L'exploitation d'innovations informatiques et des compétences requises a contribué à transformer une information 2D réelle (ex : un ensemble de contours) en une information 3D virtuelle (ex : un tubule sur une image écran).

Plusieurs systèmes de modélisation ont participé à l'élaboration de résultats :

SSRCON system

« SSRCON system » développé au sein du « National Institute for Medical Research » (London, UK) a permis de réaliser la reconstruction tridimensionnelle des régions sensorielles de l'oreille interne d'un embryon de souris de 17,5 jours de gestation. Soit à partir des lames pour les contours, soit à partir de photographies pour le marquage, les différents tracés ont été dessinés par l'intermédiaire d'une table à digitaliser. Le rendu de cette reconstruction est en fait un empilement de contours et une

disposition calculée et précise du marquage radioactif. De plus, ce système offre la possibilité d'une observation stéréoscopique des résultats et une situation de l'expression du proto-oncogene int-2 révélée par hybridation in situ. Cette étude localise les sites d'expression du proto-oncogène dans la cochlée, le saccule, l'utricule et l'ampoule des canaux semicirculaires (Wilkinson and Green, 1990 [137]).

Neurolucida system

Le « système Neurolucida » peut rendre possible la visualisation de l'ensemble des coupes sériées histologiques en traçant les contours observés au microscope optique à la chambre claire. L'ovaire reconstruit correspond uniquement à une superposition des contours (Rajah *et al*, 1992 [96]).

A data-driven approach

« A data-driven approach » mis au point par F-J. Verbeek a permis de représenter schématiquement les unités néphriques ainsi que la localisation de l'expression de certaines enzymes dans le mésonéphros d'embryons humains (Figure 21 ; Dingemans and Lamers, 1994 [17]). La technique a été appliquée sur le cœur embryonnaire par simple empilement de contours. Cette approche ne crée pas un réel objet 3D, et ne fait pas disparaître l'artefact de distorsion généré par la microtomie (Figure 22 ; Verbeek *et al*, 1995 [128]). Les résultats obtenus par ces 2 systèmes « Neurolucida » et « a data-driven approach » sont d'une qualité voisine de ceux obtenus par le système « SSRCON ».

STERECON system

Le « système STERECON » (STEREoscopic RECONstruction system) crée des reconstructions 3D à partir de contours tracés manuellement ou automatiquement. Ce système permet de réaliser des analyses quantitatives et statistiques. La reconstruction peut être représentée par un simple empilement des contours ou par création d'une surface à partir de facettes entre les contours (Marko and Leith, 1992 [67]). Cette méthode est la plus usitée pour des coupes histologiques de microscopie optique et d'une manière plus conventionnelle pour des coupes fines de microscopie électronique. Par exemple, une portion de membrane cellulaire est représentée sous un modèle en fil de fer et les organites internes sont disposés sous forme de surfaces ombrées.

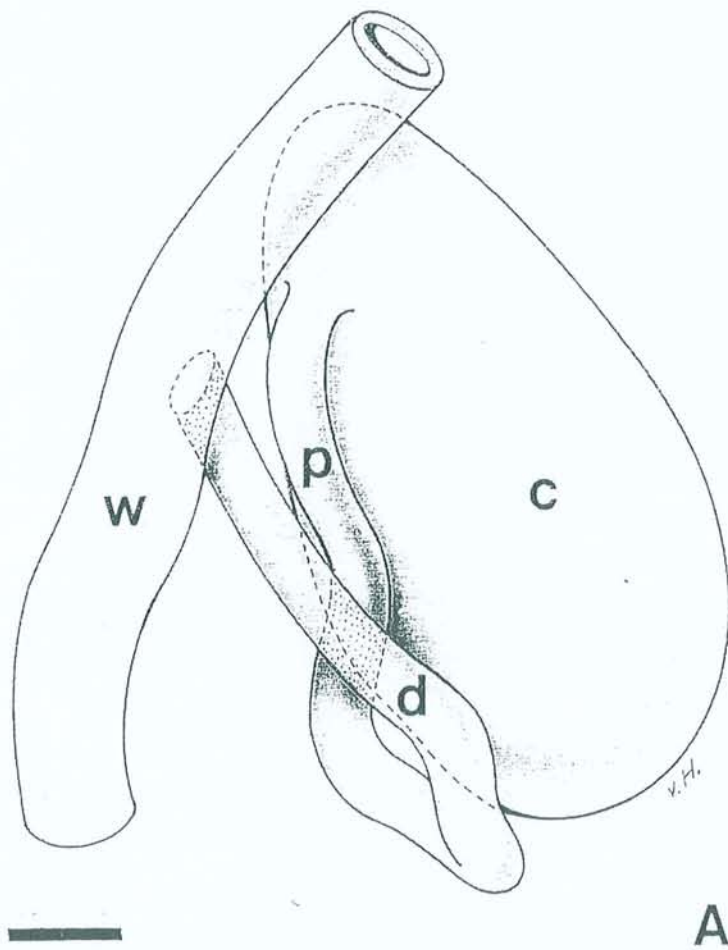


Figure 21 : Représentation graphique d'une unité néphrique d'un mésonéphros d'embryon humain de 5,5 semaines d'âge (Dingemans and Lamers, 1994).

(c : capsule de Bowman ; d : tubule distal ; p : tubule proximal; w : canal de Wolff , échelle : 25 μ m)

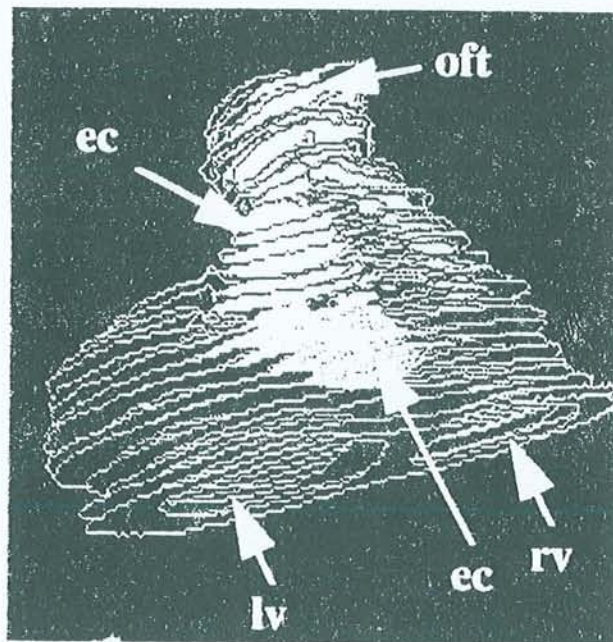


Figure 22 : Reconstruction tridimensionnelle par empilement de contours de coupes s eries du c eur embryonnaire (Verbeek *et al*, 1995).

(ec : endocardial cushions/bourrelets endocardiques, lv : left ventricule/ventricule gauche, oft : outflow tract/sortie pulmonaire, rv : right ventricule/ventricule droit)

Ce système a permis de reconstituer à partir de coupes histologiques le larynx embryonnaire chez la souris par une représentation surfacique ombrée. Cette reconstruction surfacique utilise la technique d'un rendu stéréoscopique à partir de contours. Les contours tracés sur transparents de la structure étudiée à l'aide d'une table à digitaliser sont projetés sur l'écran d'un autre moniteur par l'intermédiaire d'un miroir placé à 45°. Là, de nouveaux contours sont tracés à partir d'une image virtuelle. Les contours générés et les contours d'origine peuvent être importés pour une manipulation de l'objet reconstruit. La simple disposition des contours peut contribuer à un résultat, le plus souvent, il s'agit d'un remplissage des contours avec l'utilisation de l'algorithme du « peintre » qui améliore la perception de la profondeur à l'intérieur de la reconstruction. Les images stéréoscopiques sont alors visualisées à travers des lunettes polarisantes (Figure 23A à 23D ; Marko and Leith, 1996 [68]). Ce système présente l'avantage de réaliser des objets complexes en 3D avec un meilleur rendu visuel grâce à l'algorithme du « peintre » par rapport aux 3 systèmes précédents.

IMOD

« IMOD » est un outil pour l'analyse et la visualisation d'images 3D biologiques. L'objet reconstruit peut être visualisé soit par un rendu volumique, soit par un rendu surfacique à partir de contours de données tomographiques (Figures 24A et 24B). Ce système est aussi capable de fournir des données numériques. Il peut mesurer des surfaces, des volumes et les longueurs des contours ainsi que compter les éléments constitutifs de l'objet obtenu. Ce système s'applique aussi à des informations provenant de coupes sériées de microscopie électronique, comme par exemple la reconstruction 3D d'une division mitotique au niveau d'une cellule de type sauvage d'un mycète (Figure 24C). De plus, IMOD a permis de reconstruire une cellule-12 d'un embryon de *C.elegans* à partir de données optiques (Figure 24D ; Kremer *et al*, 1996 [56]). Ce système est plus performant que le « SSRCON system » et que le « STERECON system ». En plus de son adaptabilité à différentes sources de données, « IMOD » permet d'obtenir des reconstructions 3D avec un rendu volumique.

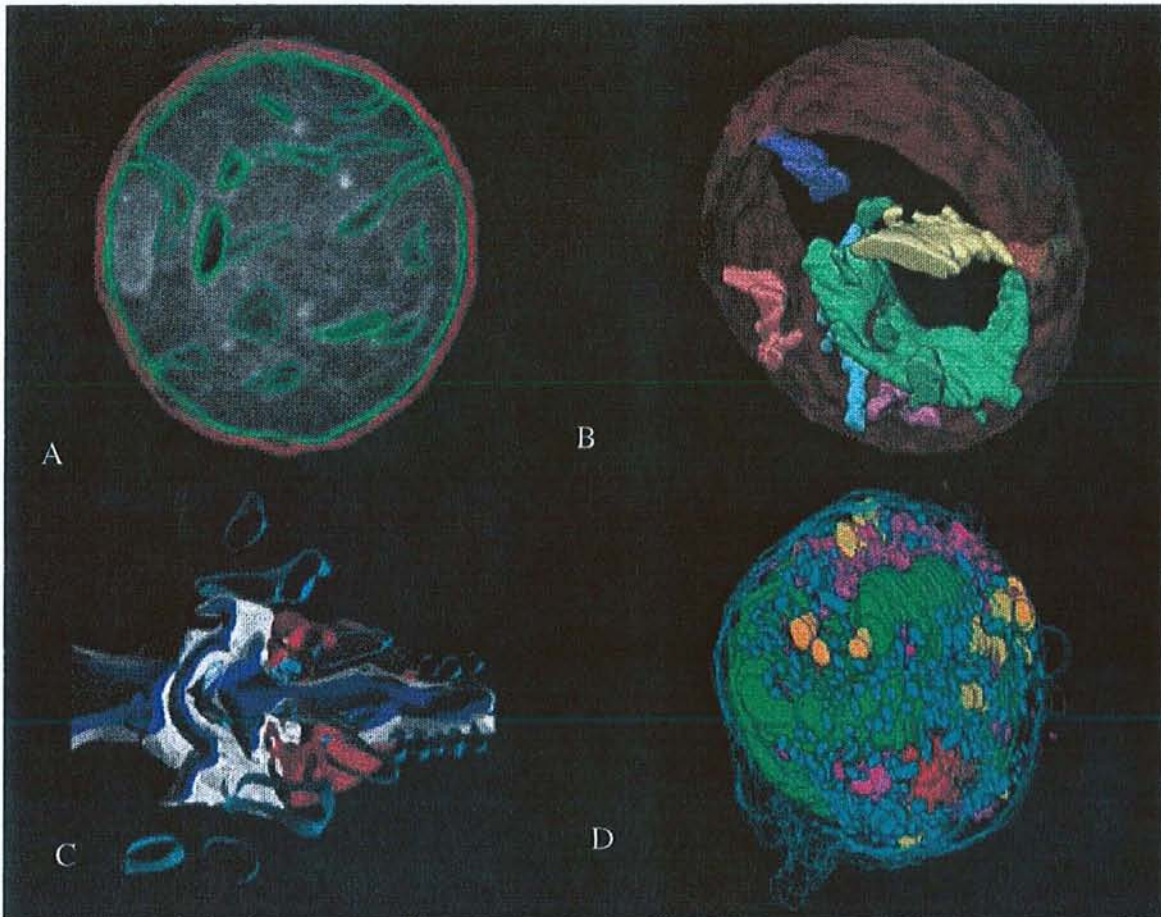


Figure 23: Réalisations à l'aide de STEREOCON (Marko and Leith, 1996).

(A: Portion d'un HVEM tomographique d'une mitochondrie avec leurs membranes et B: Reconstruction 3D avec un rendu surfacique de la mitochondrie. C: Reconstruction 3D avec un rendu surfacique du larynx de souris, à partir de coupes histologiques sériées avec le cartilage et la trachée en bleu clair, le muscle en rouge, le passage de l'air en bleu foncé et l'épithélium en blanc. D: Disposition d'un ensemble de contours d'un lymphocyte humain à partir de coupes sériées avec le noyau en vert, les mitochondries en bleu, les vésicules golgiennes en rose, les amas lipidiques en jaune et l'interféron en rouge.)

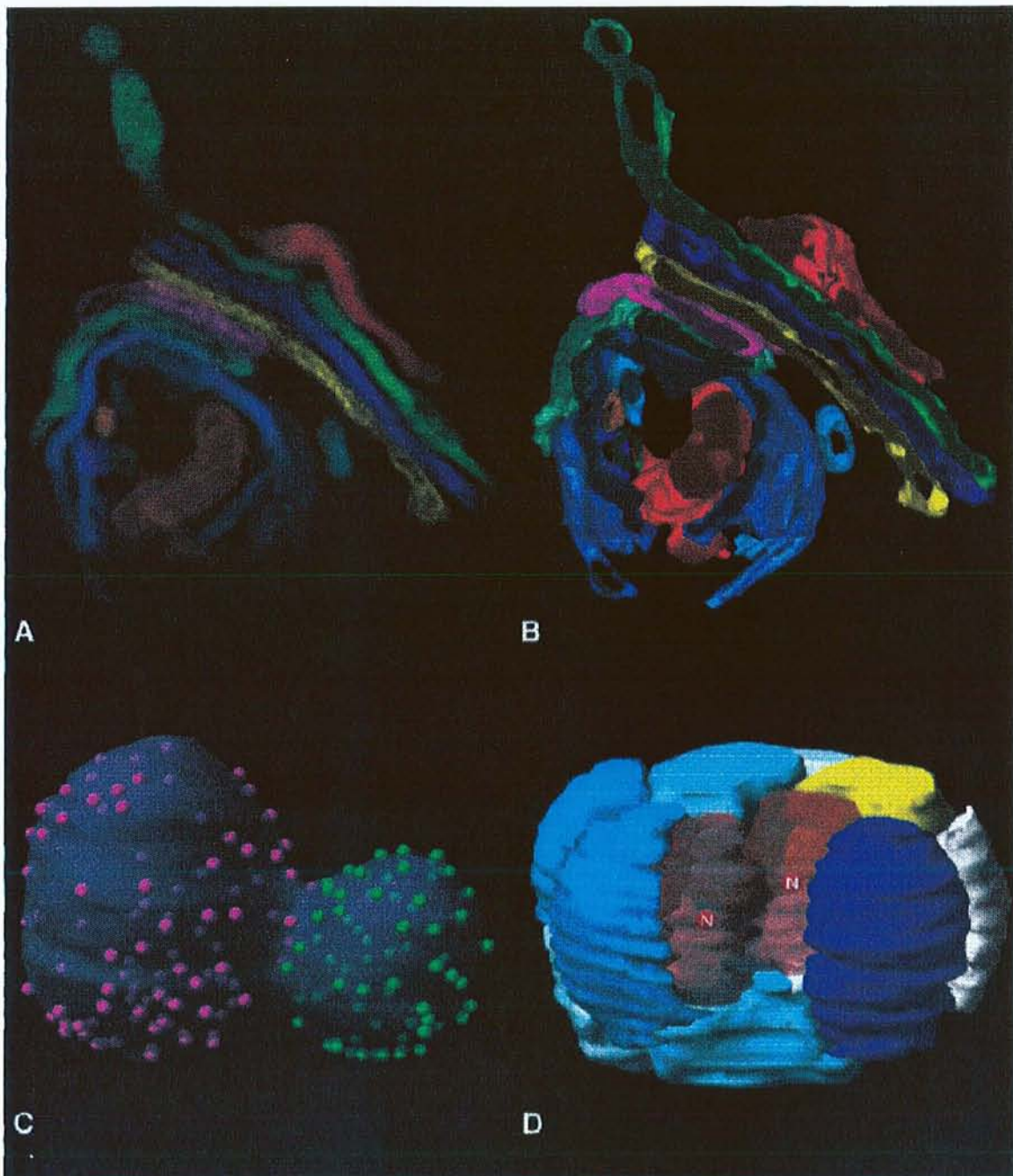


Figure 24 : Reconstitutions à l'aide d'IMOD (Kremer *et al*, 1996).

(A et B : Reconstitutions de l'appareil de Golgi à partir des contours de données tomographiques avec un rendu volumique en A et avec un rendu surfacique en B. C : Reconstitution d'un noyau mitotique d'une cellule de levure basée sur des coupes sériées à partir de micrographies électroniques. D : Reconstitution d'une cellule-12 d'un embryon de *C.elegans* basée sur des coupes optiques montrant les noyaux.)

RECON

« RECON » est un système générant des représentations 3D à partir de coupes sériées de tissu neuronal obtenues par microscopie électronique à transmission. La reconstruction est réalisée par un maillage entre les contours conférant à la surface un aspect grillagé, dont la représentation est en fil de fer et sa visualisation correspond à un objet solide avec un rendu volumique (Montgomery and Ross, 1996 [79]). Ce système dispose seulement d'un rendu volumique alors que le système « IMOD » peut aussi utiliser un rendu surfacique si celui-ci est suffisant.

REYES

Le programme « REYES » procède par une importation des contours tracés manuellement en utilisant une table à digitaliser, puis la modélisation surfacique passe par un alignement et un empilement des contours.

L'inconvénient majeur de cette reconstruction est l'absence de lissage qui donne à l'objet un aspect dentelé très prononcé du fait de la distorsion engendrée au cours de la section des coupes. Cet aspect dentelé ne paraît pas aussi marqué dans les reconstructions obtenues par les systèmes « IMOD » et « STEREOCON ».

Cette méthode a permis de reconstruire la connexion entre le canal mésonéphritique et le mésenchyme métanéphrique chez des embryons murins *ld/ld* de 12,5 jours (Maas *et al*, 1994 [63]).

Skandha system

Le « système Skandha » traite des coupes sériées histologiques en les projetant sur une table à digitaliser. Une fois les contours digitalisés, un assemblage automatique est réalisé. La rotation de l'objet reconstruit dans l'espace est ensuite possible. Ces techniques de reconstruction 3D ont été appliquées sur la région palatine primaire d'embryons humains normaux (Rudé *et al*, 1994 [102]). Par un système analogue, une équipe japonaise (Saitoh *et al*, 1990 [106]) a reconstruit les cônes efférents de l'épididyme humain.

AutoCAD

Le système de reconstruction 3D « AutoCAD » appliqué en biologie sur des coupes histologiques sériées a permis de reconstruire à partir de contours digitalisés une représentation en fil de fer du cordon ombilical par des facettes quadrangles jointives en z mais irrégulièrement disposées en x et y (Figure 25). L'image synthétisée en 3D est obtenue par un montage stéréoscopique (Ongaro *et al*, 1991 [85]). Une amélioration dans la représentation surfacique par un maillage de l'objet et un ombrage adéquat, a permis de réaliser des travaux conséquents sur la morphogenèse de l'embryon humain normal à partir de coupes histologiques sériées (Figure 26 ; Machin *et al*, 1996 [65]). Ces 2 systèmes « Skandha » et « AutoCAD » sont probablement aussi bien adaptés que le système « IMOD » à l'exploitation des coupes histologiques. Le maillage mis au point dans « AutoCAD » améliore le rendu surfacique des objets reconstruits. De plus, « AutoCAD » est disponible sous forme de shareware en libre accès.

NeuRef system

Le «système NeuRef» (Neuroanatomical Reference system) a permis la reconstruction 3D, par la méthode de triangulation de Fuchs (1977) [26], du système limbique avec l'hippocampe, le corps du fornix et les corps mamillaires à partir de contours scannés, digitalisés en lignes polygonales. Cette étude de la neuroanatomie du système limbique offre des données numériques intéressantes mais avec une qualité d'image restant à améliorer (Gerke *et al*, 1992 1 [32] ; 1992 2 [33]). Il a été possible de comparer des mesures connues par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) avec les dimensions obtenues par tomographie. La technique est basée sur la projection de voxels et a permis d'étudier la taille des structures et leur localisation.

gOcad

Grâce à la méthode d'implémentation de Boissonnat (1988) [7] associée au lissage de Gouraud (1971) [35] ou de Phong (1975) [93], les cartilages crâniofaciaux chez des souris adultes ont été reconstruits à partir de coupes sériées histologiques (Lozanoff and Deptuch, 1991 [61]). Cette méthode correspond à la base du logiciel gOcad, méthode utilisée dans cette étude et présentée dans le chapitre suivant.

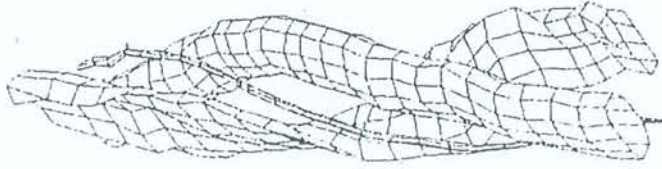
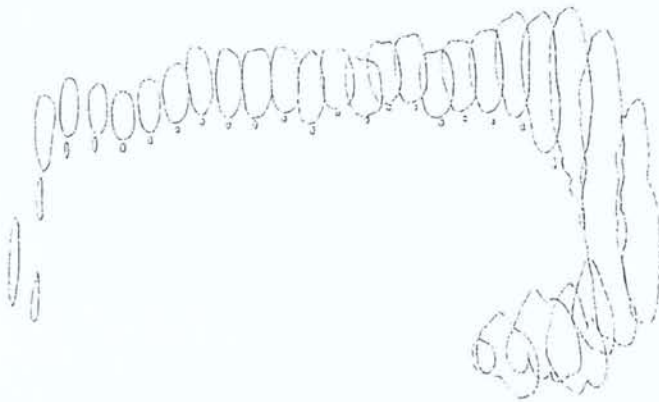
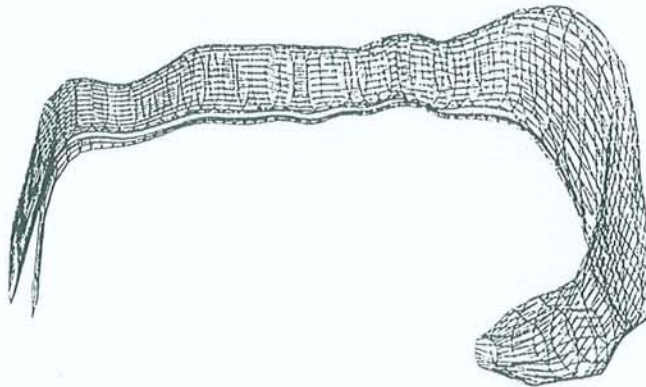


Figure 25 : Représentation en fil de fer du cordon ombilical (Ongaro *et al*, 1991).



a



b

Figure 26 : A partir d'un empilement de contours (a), le maillage du tube nerveux et de la notochorde est réalisé avec une représentation en fil de fer (b) (Ongaro *et al*, 1991).

2. MATÉRIELS ET METHODES

2.1. Le matériel biologique employé

2.1.1. Echantillons humains

2.1.1.1. Obtention des embryons

Ces embryons humains, fixés au formol, ont été collectés au Japon et sont issus d'interruptions volontaires de grossesse. Les mésonéphros reconstruits font partie d'une collection d'embryons humains constituée entre 1970 et 1971 par le Pr. A. Dollander de la Faculté de Médecine de Nancy I.

2.1.1.2. Nombre et âge des embryons

L'étude est réalisée sur trois embryons de 7,4 mm, 11 mm et 16 mm. Grâce aux tableaux de référence A et B (Dollander et Fenart, 1979 [18]), les correspondances suivantes sont données dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Correspondances des stades étudiés.

longueur	stade O'Rahilly	âge estimé d'ovulation
7,4 mm	stade 15	4 semaines (30 jours)
11 mm	stade 17	6 semaines (42 jours)
16 mm	stade 19	7 semaines (50 jours)

Abréviations:

longueur : longueur de l'embryon en mm (CR-length)

CR-length = Crown Rump-length : longueur mesurée du sommet du crâne ou vertex à la croupe ; ce qui équivaut à celle prise du vertex au repère lombaire = VL.

2.1.1.3. Sexe des embryons

Seuls pour les deux derniers embryons de 6 et 7 semaines, le sexe gonadique a pu être déterminé par l'observation des coupes histologiques. Le premier est un embryon mâle et le second un embryon femelle (Tableau 2).

2.1.1.4. Préparation histologique

Les embryons fixés au formol à 10 % ont été traités classiquement pour des inclusions à la paraffine. Des coupes sériées à 7 µm d'épaisseur sont étalées et colorées à l'hémalun-éosine-safranine. Les noyaux sont colorés à l'hémalun et à la safranine par une teinte bleue-verte et les cytoplasmes à l'éosine. Cette méthode de triple coloration permet de visualiser facilement les tubules appartenant à la région mésonéphritique (Figures 27 à 29).

Tableau 2 : Identification des mésonéphros étudiés.

Identification des embryons			Caractéristiques du mésonéphros étudié			
			anatomiques		histologiques	
longueur (e)	âge	sexe	longueur (m)	situation	épaisseur	coupes
7,4 mm	4 sem	nd	1,55 mm	droite	7 µm	222
11 mm	6 sem	mâle	1,13 mm	gauche	7 µm	162
16 mm	7 sem	femelle	2,04 mm	gauche	7 µm	290

Abréviations:

nd : non défini

sem : semaine

longueur (e) : longueur de l'embrion en mm

longueur (m) : longueur du mésonéphros en mm.

2.1.2. Échantillons murins

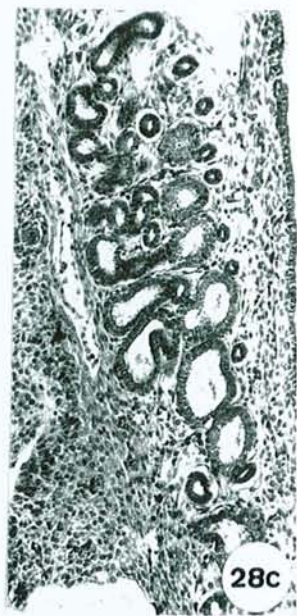
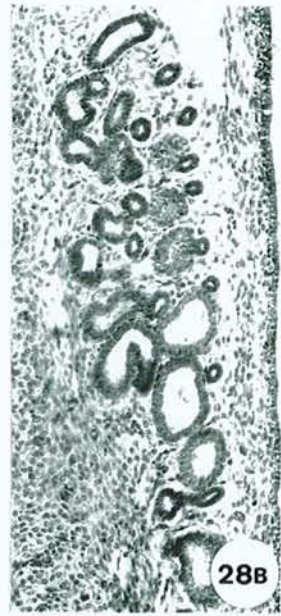
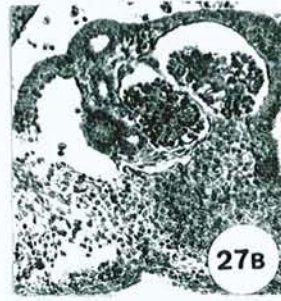
2.1.2.1. Obtention des embryons d'âges connus

Les mésonéphros ont été obtenus à partir d'embryons de souris non consanguines IOPS, OF1 Ico : OF1 (IOPS Caw) de chez IFFA Credo. L'obtention des embryons de souris d'âges connus passe par un accouplement contrôlé. Six femelles de plus de 10 semaines ont été placées dans la cage d'un mâle, vers 17 h, et examinées le lendemain vers 8 h. L'élément indicateur de l'accouplement est l'apparition d'un bouchon vaginal, liquide coagulé provenant de glandes vésiculaires du mâle qui obstrue l'orifice vaginal. L'accouplement n'est possible qu'avec une femelle en période d'ovulation ou œstrus. La ponte ovulaire sert de point de repère du début de la gestation, en admettant que l'heure de l'ovulation est 1 h du matin et que la fécondation se produise dès l'ovulation. Le temps t0 du développement est déterminé à 1 h du matin. Les embryons provenant de la dissection d'une mère gestante à 10 h du matin 10 jours après la découverte du bouchon vaginal, sont âgés de 10,5 jours (Rugh, 1968 [103] ; Theiler, 1972 [120]).

Figure 27 : Coupes histologiques transversales du mésonéphros humain de 4 semaines (A-B) (x 60),

Figure 28 : Coupes histologiques longitudinales du mésonéphros humain de 6 semaines (A-C) (x 60),

Figure 29 : Coupes histologiques transversales du mésonéphros humain de 7 semaines (A-F) (x 60).



2.1.2.2. Récolte des embryons

La mère gestante est anesthésiée au pentobarbital (40 à 70 mg/kg) en injection intrapéritonéale. Une incision médio-ventrale est effectuée. Les embryons sont dégagés un par un des cornes utérines. Plus le stade embryonnaire est tardif, plus le prélèvement tissulaire peut être précis. Les jeunes embryons de 10,5 jours ont été totalement fixés du fait de leur petite taille et de leur fragilité. Pour les embryons plus âgés de 11,5 à 15,5 jours (10 à 15 mm), seule la région abdominale contenant la région mésonéphritique a été prélevée. Puis la région mésonéphritique, elle-même, a été fixée.

2.1.2.3. Sexage des embryons

La constitution gonosomique des embryons de souris a été déterminée par la méthode de la chromatine sexuelle, dans les cellules de la membrane amniotique, en utilisant une technique voisine de celle de Farias, Kajii et Gardner (1967) [24] et reprise par Jost (1972) [45] : la membrane amniotique, bien étalée sur une lame est colorée par l'orcéine acétique (2 g d'orcéine dans 45 ml d'acide acétique, diluée de moitié avec de l'eau distillée au moment de l'emploi). Au sein de chaque portée, la méthode de la chromatine sexuelle a été appliquée sur chacun des embryons. Chez les embryons femelles, les cellules de la membrane amniotique présentent 22 à 55 % de chromatine sexuelle alors que chez les embryons mâles, leur pourcentage varie de 0 à 7% (Farias *et al*, 1967 [24]). Le sexe gonadique des embryons a pu être comparé à la constitution gonosomique, à partir des coupes histologiques d'embryons âgés d'au moins 12,5 jours.

2.1.2.4. Essais d'inclusions et réalisations de coupes histologiques

Pour obtenir des données tissulaires exploitables, différentes méthodes de prélèvements ont été testées.

2.1.2.4.1. Inclusion au méthyl-méthacrylate

Concernant des embryons de souris, des tentatives d'inclusion au méthyl-méthacrylate ont été menées à plusieurs reprises. Le fixateur utilisé pour la conservation des échantillons est l'éthanol à 70° et il assure en même temps la déshydratation

pendant une semaine. Celle-ci est poursuivie par une déshydratation progressive, puis par 2 bains de toluène. Le milieu d'imprégnation et d'inclusion est composé du mélange suivant :

- méthacrylate (200 ml) : c'est un plastique monomère, liquide et volatile. Il est stocké à une température de 4°C, avec adjonction d'hydroquinone comme stabilisateur,
- peroxyde de benzoyle (7 g) : c'est un durcisseur qui intervient comme amorceur de la polymérisation par formation de radicaux libres,
- dibutylphtalate (50 ml) : c'est un plastifiant qui, en s'interposant entre les chaînes de polymère, rend le bloc de résine moins cassant et plus souple à la coupe.

Le méthacrylate est dégazé avant et pendant l'imprégnation à l'aide d'une pompe à vide. Les opérations d'imprégnation et d'inclusion se succèdent. La technique pratiquée s'appuie sur une polymérisation et cette réaction s'accompagne d'un dégagement de chaleur et ne doit pas dépasser 45 à 50°C afin d'éviter une autocatalysation (Membre, 1990 [72]).

Ces tentatives ont échoué car les échantillons ont éclaté. Ce problème semblait être en désaccord avec toutes les expérimentations réalisées avec succès sur l'os. Il s'agissait d'un problème d'osmolarité et de dégazage faisant éclater les cellules. Récemment, la solution à cet éclatement de cellules a été trouvée pour une étude sur les otoconies de l'oreille interne chez le Pleurodèle (Oukda *et al*, en préparation [86]). A l'aide d'un micro-osmomètre, on définit l'osmolarité d'un broyat embryonnaire et en fonction de celle-ci, on adapte un fixateur d'osmolarité équivalente.

2.1.2.4.2. Inclusion à l'épon

Des essais de réalisation de coupes semi-fines ont été tentés. Les échantillons prélevés, fixés pendant 4 h à température ambiante avec une solution de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,1 M, pH 7,4), déshydratés dans des bains progressifs d'alcool, subissent une préimprégnation avec un volume de propylène et un volume d'épon 812 (CIPEC, Paris, France) pendant 1 h, puis l'échantillon est imprégné dans l'époxy pendant une quinzaine d'heures à température ambiante. L'inclusion est réalisée dans des moules avec un mélange frais d'épon dont la polymérisation à l'étuve à 56°C pendant au moins 48 h assure le durcissement. Des coupes semi-fines de 1 µm

d'épaisseur sont réalisées avec un ultramicrotome Reichert-Jung à couteau de diamant, étalées sur lame de verre, séchées et colorées au bleu azur II. L'obtention de coupes successives s'est avérée difficilement gérable. La grande difficulté est de garder une régularité dans la sélection des coupes conservées. Même si l'épaisseur des coupes d'1 μm améliore la précision, le choix ne s'est pas porté sur cette technique du fait de la nécessité d'une grande rigueur dans la numérotation des coupes conservées et d'une augmentation considérable du nombre de coupes, sachant que l'étude comportait 75 embryons. De plus, il est nécessaire de bien évaluer le nombre de coupes erronées, déchirées ou perdues.

2.1.2.4.3. Inclusion à la paraffine

Après ces 2 tentatives, la méthode des coupes histologiques sériées a été abordée à partir d'échantillons fixés au Bouin picrique et inclus à la paraffine. Cette technique présente l'avantage majeur de fournir toutes les coupes de la zone étudiée ; très rarement une coupe peut être perdue ou déchirée. De plus, l'épaisseur des coupes présente une bonne régularité. En revanche, un phénomène de distorsion à l'étalement apparaît et pose un problème d'irrégularités lors de la superposition des coupes. Cette incertitude a été minimisée objectivement, par l'application d'un lissage sur l'objet reconstruit, proposé par gOcad et présenté dans le paragraphe 2.3.3.4.. L'obtention des coupes sériées à 5 μm d'épaisseur demande beaucoup de rigueur mais s'effectue relativement vite puisque le nombre de coupe est largement réduit par rapport aux coupes semi-fines d'1 μm d'épaisseur. Ces deux attraits se sont révélés des atouts pour un choix vers cette méthode de préparation de coupes histologiques inclus à la paraffine.

2.1.2.5. Préparation histologique

Les embryons murins ont été fixés au liquide de Bouin (1902) à des temps variant de 7 à 48 h selon leur longueur, puis ont été déshydratés par des bains successifs à l'alcool 70°, 95°, 100°. La durée des bains dépend de l'âge des embryons (Tableau 3). Après déshydratation, suivie d'un bain de toluène, les embryons sont inclus dans la paraffine. Des coupes sériées à 5 μm d'épaisseur ont été réalisées et étalées, puis colorées à l'hématoxyline de Gomori-Ponceau-Fuschine-Vert Lumière (Martoja et Martoja, 1967 [69] ; Gabe, 1968 [28]). Les coupes sont ensuite observées au microscope

optique, où la région mésonéphritique est repérée par rapport aux crêtes génitales (Figs. 30 à 33).

Tableau 3 : Durée des bains en fonction de l'âge des embryons.

type de bains	Âge des embryons (jours)		
	à 10,5	entre 11,5 et 12,5	entre 13,5 à 15,5
alcool 70°	3 x 8 heures	3 x 8 heures	3 x 8 heures
alcool 95°	3 x 2 heures	3 x 4 heures	3 x 4 heures
alcool 100°	3 x 30 minutes	3 x 1 heure	3 x 1 heure
toluène	2 x 5 minutes	3 x 20 minutes	3 x 20 minutes

2.1.2.6. Nombre d'embryons utilisés

Pour chaque stade embryonnaire, 3 portées de mâles et 1 portée de femelles ont été obtenues : 9 embryons mâles et 3 embryons femelles ont été récoltés. Dans chacune de ces portées, seuls trois embryons de même sexe ont été retenus. Les tableaux 4 à 9 présentent l'échantillonnage des portées et des embryons.

Tableau 4 : Mésonéphros d'embryons de 10,5 jours.

N° Portée 10,5	Sexe	N° des embryons	Nb de coupes	Longueurs des mésonéphros
1 ^{ère}	Mâle	1-2-3	79-23-34	395-115-170 µm
2 ^{ème}	Mâle	4-5-6	53-105-149	265-525-745 µm
3 ^{ème}	Mâle	7-8-9	66-74-74	330-370-370 µm
4 ^{ème}	Femelle	10-11-12	18-34-27	90-170-135 µm

Tableau 5 : Mésonéphros d'embryons de 11,5 jours.

N° Portée 11,5	Sexe	N° des embryons	Nb de coupes	Longueurs des mésonéphros
1 ^{ère}	Mâle	1-2-3	178-134-91	890-670-455 µm
2 ^{ème}	Mâle	4-5-6	146-107-65	730-535-325 µm
3 ^{ème}	Mâle	7-8-9	143-135-40	715-675-200 µm
4 ^{ème}	Femelle	10-11-12	115-147-140	575-735-700 µm

Tableau 6 : Mésonéphros d'embryons de 12,5 jours.

<i>N° Portée 12,5</i>	<i>Sexe</i>	<i>N° des embryons</i>	<i>Nb de coupes</i>	<i>Longueurs des mésonéphros</i>
1 ^{ère}	Mâle	1-2-3	91-125-136	455-625-680 µm
2 ^{ème}	Mâle	4-5-6	113-149-157	565-745-785 µm
3 ^{ème}	Mâle	7-8-9	114-144-125	570-720-625 µm
4 ^{ème}	Femelle	10-11-12	57-54-131	285-270-655 µm

Tableau 7 : Mésonéphros d'embryons de 13,5 jours.

<i>N° Portée 13,5</i>	<i>Sexe</i>	<i>N° des embryons</i>	<i>Nb de coupes</i>	<i>Longueurs des mésonéphros</i>
1 ^{ère}	Mâle	1-2-3	69-71-72	345-355-360 µm
2 ^{ème}	Mâle	4-5-6	132-125-139	660-625-695 µm
3 ^{ème}	Mâle	7-8-9	98-150-165	490-750-825 µm
4 ^{ème}	Femelle	10-11-12	78-63-85	390-315-425 µm

Tableau 8 : Mésonéphros d'embryons de 14,5 jours.

<i>N° Portée 14,5</i>	<i>Sexe</i>	<i>N° des embryons</i>	<i>Nb de coupes</i>	<i>Longueurs des mésonéphros</i>
1 ^{ère}	Mâle	1-2-3	84-99-96	420-495-480 µm
2 ^{ème}	Mâle	4-5-6	101-111-139	505-555-695 µm
3 ^{ème}	Mâle	7-8-9	66-86-71	330-430-355 µm
4 ^{ème}	Femelle	10-11-12	114-116-116	570-580-580 µm

Tableau 9 : Mésonéphros d'embryons de 15,5 jours.

<i>N° Portée 15,5</i>	<i>Sexe</i>	<i>N° des embryons</i>	<i>Nb de coupes</i>	<i>Longueurs des mésonéphros</i>
1 ^{ère}	Mâle	1-2-3	69-79-45	345-395-225 µm
2 ^{ème}	Mâle	4-5-6	79-100-93	395-500-465 µm
3 ^{ème}	Mâle	7-8-9	120-109-102	600-545-510 µm
4 ^{ème}	Femelle	10-11-12	92-75-116	460-375-580 µm

Abréviations:

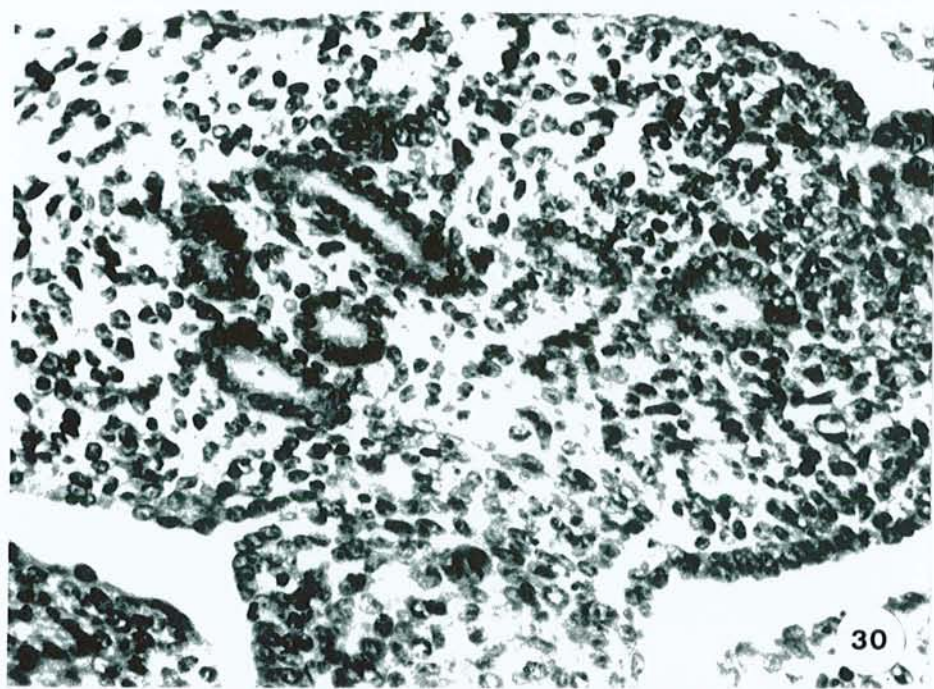
N° Portée : Numéro des portées,

N° des embryons : Numéro des embryons,

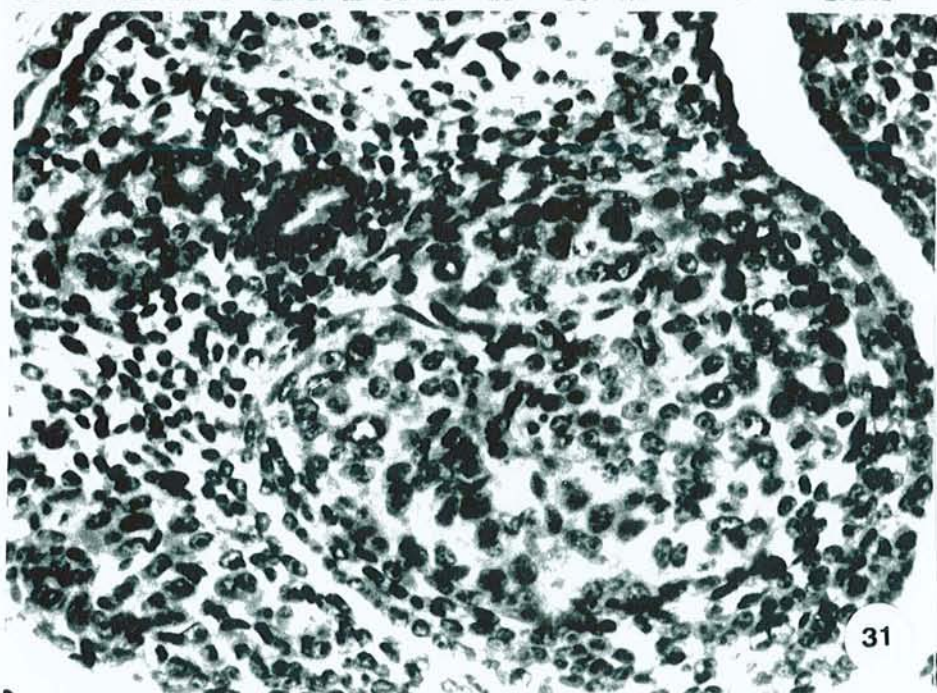
Nb de coupes : Nombre de coupes histologiques par mésonéphros.

Figure 30 : Coupe histologique d'un mésonéphros mâle murin de 12,5 jours où les tubules mésonéphritiques sont visibles (x 160),

Figure 31 : Coupe histologique d'un mésonéphros mâle murin de 12,5 jours où la région gonadique présente le début de la formation des cordons séminifères et où l'albuginée s'épaissit (x 160).



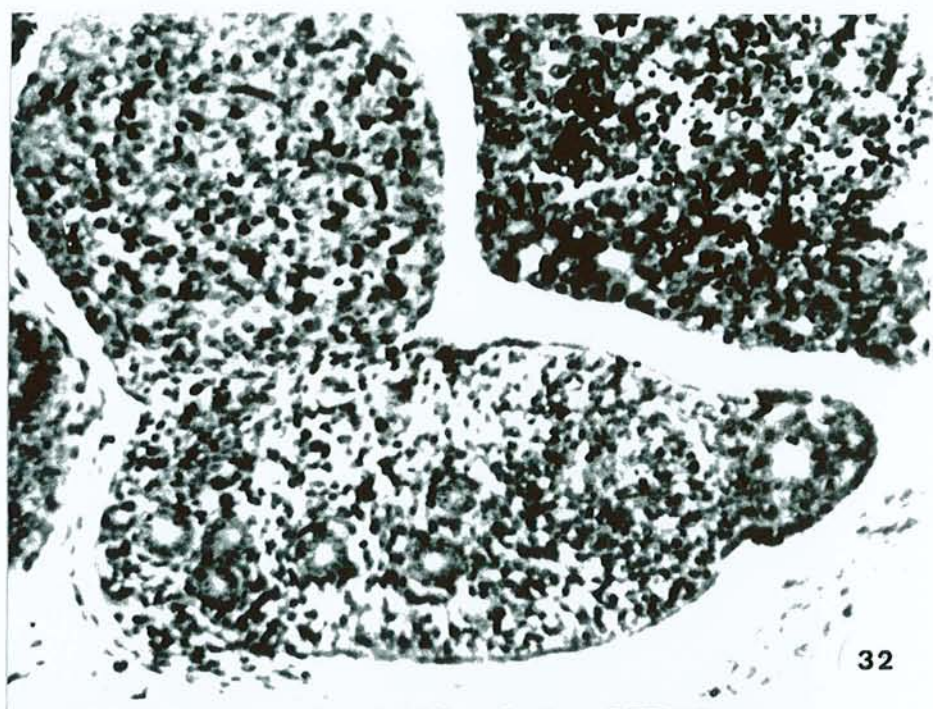
30



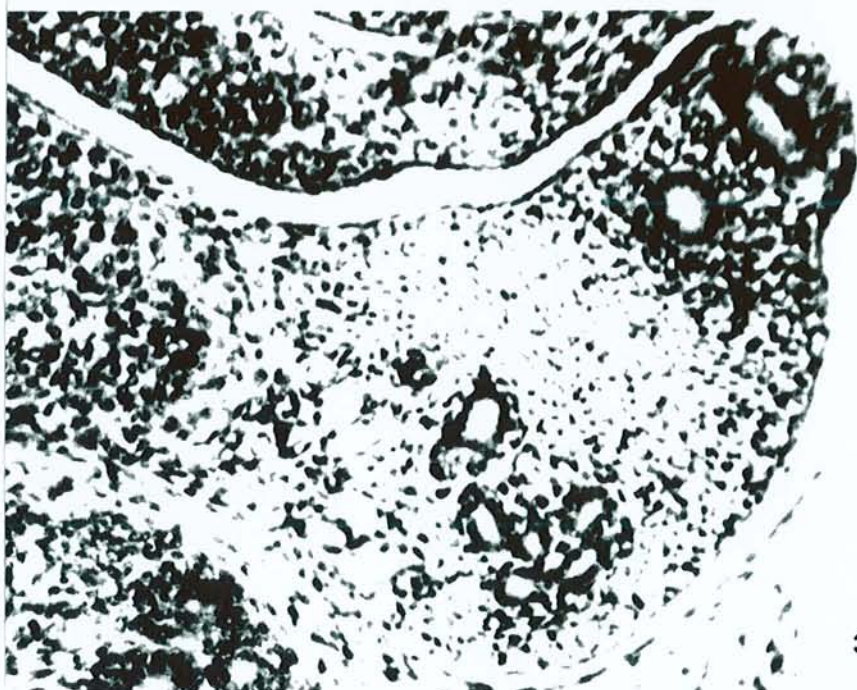
31

Figure 32 : Coupe histologique d'un mésonéphros femelle murin de 14,5 jours (x160),

Figure 33 : Coupe histologique d'un mésonéphros mâle de 15,5 jours où les cordons séminifères sont bien visibles (x160).



32



33

2.2. Sélection de l'outil informatique

Une fois les coupes sériées réalisées, le système de modélisation informatique le plus adapté a été recherché.

2.2.1. Essais avec VISIO 3D

Les premiers essais de reconstruction 3D ont été effectués au moyen d'un microscope optique associé à un ordinateur par une caméra. Une station BIOCOM (Service Commun de Microscopie Electronique, Faculté de Médecine de Nancy I) offrait la possibilité de dessiner les contours des tubules en cliquant au niveau des points de courbure remarquables des tubules. La grande difficulté résidait dans le discernement des cellules constitutives de la limite tubulaire. Cette absence de spécificité aurait pu être contournée par un marquage spécifique des cellules appartenant à la surface du mésonéphros ; mais la solution n'a pas encore été trouvée.

Les essais ultérieurs sur la station BIOCOM n'utilisaient plus que la chambre claire pour reporter les contours des tubules sur transparents.

Avec la collaboration de M. Tajani (Université Mac Gill, Montréal, BIOCOM) initiateur du développement du logiciel VISIO 3D, la reconstruction d'un mésonéphros de 12,5 jours a été tentée mais deux problèmes se sont présentés. Le premier est l'incapacité du logiciel VISIO 3D à générer des formes tubulaires dichotomiques. Le second est d'ordre quantitatif, et correspond à une non-gestion de 57 coupes comportant 23 régions (BIOCOM, Les Ulis, M. Dohy).

2.2.2. Essais avec MEDICAD

Une première reconstruction 3D a pu être envisagée sur 8 connexions : cônes efférents-rete testis d'un nouveau-né de souris. Les tubules ont été tracés manuellement de la même façon que précédemment. Chaque transparent est ensuite filmé permettant de reconstruire des surfaces tubulaires à l'aide d'un prototype qui est devenu le logiciel MEDICAD et mis au point par S. Qiang. Le seul problème était les moyens informatiques incompatibles avec l'étude de 72 mésonéphros murins (4 portées de 3 embryons sur 6 stades embryonnaires) et de 3 mésonéphros humains.

2.2.3. Essais avec gOcad

D'autres essais ont été réalisés au sein du laboratoire LORIA (laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications, Université Henri Poincaré, Vandoeuvres-lès-Nancy) dans l'équipe d'Infographie, à partir des coupes dessinées au moyen d'une chambre claire. Là, le logiciel gOcad proposait un système de reconstruction offrant à l'utilisateur la possibilité d'interprétation des résultats et de détermination des formes tubulaires les plus exactes. Ce logiciel résolvait le problème des structures complexes par réalisation d'embranchement et de découpage précis. Ce logiciel présentait un autre atout : la mise en œuvre d'un lissage applicable sur un ensemble de tubules. Celui-ci réduit les irrégularités dues à la distorsion provoquée lors de la coupe au microtome des blocs embryonnaires. Par ailleurs, un avantage non négligeable était l'infrastructure informatique de très haut niveau qui offrait de reconstruire au mieux les 75 mésonéphros sélectionnés. En définitive, le système de reconstruction lié à gOcad était le mieux adapté aux exigences de reconstruction des mésonéphros humains et murins car il permettait de tenter plusieurs organisations tubulaires. Les différentes tentatives offraient la possibilité de choisir parmi les réalisations possibles et de sauvegarder la surface la plus cohérente par rapport à ce qui est connu. Ce sont les résultats de précédentes études qui ont conduit au choix du logiciel gOcad ; le cœur humain a été reconstruit à différents stades embryonnaires (Gérard *et al*, 1992 [30]) ainsi que l'oreille interne au stade 21 (Gérard *et al*, 1993 [31]). Un chondrocrâne d'un embryon de 18 mm a été reconstruit par G. Bettega en 1992 [6]. L'objectif était de reconstruire les structures cartilagineuses de la base du crâne et les différentes parties constitutives de l'appareil cardio-vasculaire d'un embryon au stade 16. D'autres applications ont été réalisées sur le même principe, comme la reconstruction d'une mandibule édentée (Molé *et al*, 1993 [76] ; 1995 [77] et 1996 [78]).

Par contre, la seule difficulté non résolue dans cette démarche est le passage obligatoire par l'acquisition manuelle des contours des tubules mésonéphritiques. L'impossibilité des saisies automatiques est liée à la difficulté de discerner les cellules constitutives de la limite périphérique d'un tubule de celles qui les entourent.

2.3. Les méthodes de reconstruction 3D de la région mésonéphritique à l'aide du logiciel gOcad

Pour reconstituer en 3D les différents mésonéphros, il faut procéder, tout d'abord, à l'acquisition des données puis à leur segmentation. Ensuite, la modélisation est envisagée.

2.3.1. L'acquisition des données

2.3.1.1. La zone étudiée

Toutes coupes sériées correspondant au mésonéphros sont traitées au même grossissement du microscope. En plus des tubules mésonéphritiques des embryons humains ou murins, chaque coupe doit contenir un repère anatomique comme l'aorte ou une partie de la gonade, afin d'assurer un alignement de la série de coupes.

2.3.1.2. Le traçage des contours

Le microscope est équipé d'une chambre claire permettant de tracer sur des transparents les contours de chacun des tubules accompagnés d'un repère anatomique servant à l'alignement. Chacune des images 2D sur transparent est reproduite sur une feuille de papier au moyen d'un négatoscope. En ayant comme seule source d'informations les contours et les repères anatomiques choisis, la méthode la plus adaptée est basée sur la triangulation.

2.3.2. La segmentation

2.3.2.1. La numérisation

Les tracés matérialisés sur les feuilles de papier sont numérisés en s'assurant de positionner chaque coupe selon les mêmes repères, pour éviter les décalages. Chaque coupe numérisée est enregistrée sous forme d'un fichier image où les contours tracés sont assimilés à une série d'informations analogiques. Ces informations sont alors converties en données numériques. Chaque fichier image comporte l'ensemble des contours d'une même coupe. Ces contours sont caractérisés par une succession de pixels

avec des coordonnées bidimensionnelles d'identification. La numérisation permet de coder l'agencement des points du tracé d'un contour par la valeur 1 pour un point du tracé et par la valeur 0 pour une absence de tracé.

2.3.2.2. La discrétisation

La discrétisation permet de sélectionner les contours choisis et de rajouter la troisième dimension absente au cours de la numérisation.

Une opération de sélection est appliquée sur chaque contour ; elle analyse les courbures de chaque contour, les caractérise et les simplifie en valeurs discontinues ou discrètes. Ce processus de discrétisation choisit les points les plus significatifs et représentatifs de la forme globale du contour traité. Cette approximation revient à transformer une ligne continue en une ligne polygonale fermée (Figure 34). Elle s'établit en trois étapes principales :

- la recherche des pixels représentant le contour le plus externe de la coupe,
- la sélection des principaux points remarquables,
- l'élimination des points qui n'altère pas la précision d'approximation.

Cette approximation conserve les points remarquables et les points d'inflexion de la courbe selon deux paramètres préalablement définis :

- le pas de parcours des points de la courbure,
- le seuil ε à partir duquel le rayon de la courbure est considéré comme trop grand.

L'illustration de ce processus peut être envisagée sur une portion de courbe. Une fois scannée, la portion de courbe correspond à une succession de pixels dont les coordonnées x et y sont connues. Tout d'abord, sa discrétisation nécessite de fixer la valeur du « pas » d'analyse : de pixel en pixel, de deux pixels en deux pixels ou de n pixels en n pixels. Ensuite, sa décomposition en segments dépend de la valeur seuil ε .

On calcule la distance d maximale entre la courbe et la droite joignant les 2 pixels candidats (P et soit A , soit B , soit C). Pour ces derniers, on considère un pas de 10 pixels séparant les pixels A , B et C , du pixel de départ P . Si la distance de la droite PA à la courbe est inférieure à ε , le pixel A n'est pas retenu et l'on calcule alors la distance de

la droite PB à la courbe. Si celle-ci dépasse ϵ , alors seul le pixel B est retenu, sinon, on poursuit en calculant la distance de la droite PC à la courbe, etc...(Figure 35).

Plus la valeur ϵ s'éloigne de la valeur seuil, plus le pixel suivant retenu est proche du pixel précédent. En conséquence, plus la valeur du seuil est basse, plus le degré de résolution de la discrétisation est grand.

Le résultat du traitement d'une coupe est un ensemble de fichiers comprenant chacun les coordonnées x et y des points sélectionnés de la ligne polygonale obtenue à partir du contour d'origine ainsi que la coordonnée z identique pour chacun des points appartenant aux contours d'une même coupe. Cette dernière est donnée par l'utilisateur et confère à chaque contour des coordonnées en trois dimensions. La décomposition des tracés en segments constitue la base de la reconstruction.

Tous les contours traités sont automatiquement classés, identifiés et enregistrés dans des fichiers utilisables par le logiciel gOcad.

2.3.3. La modélisation

2.3.3.1. La reconstruction des surfaces par triangulation

Le but recherché est de reconstruire les surfaces entre les contours digitalisés ou *P-lines* des coupes sériées par des facettes triangulaires.

Ces *P-lines* contiennent des atomes entre chaque segment de droite qui correspondent à des entités topologiques. Celles-ci caractérisent les relations de voisinage avec les triangles qui se juxtaposent entre deux *P-lines* successives (Figure 36). Chaque triangle ou *trgl-t* est constitué de trois atomes dont les sommets précisent leur position dans l'espace (Figure 37).

Les triangles sont adjacents les uns par rapport aux autres. L'assemblage de ces facettes triangulaires compose une surface ou *T-surf* qui permet de modéliser l'objet étudié.

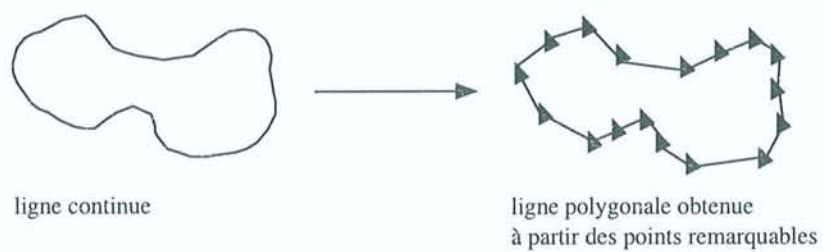


Figure 34 : Schématisation de la discrétisation.

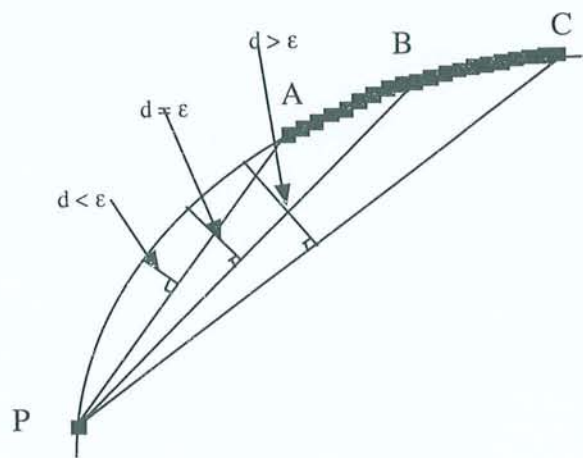


Figure 35 : Résolution de la discrétisation.

Il est intéressant de disposer d'une partie de coupes ou de la totalité, pour obtenir une représentation interne de l'aspect partiel ou global de l'objet à reconstruire. Ceci permet d'adopter une stratégie d'exécution en abordant la reconstruction soit coupe par coupe quand la structure est très complexe ou alors par groupe de coupes quand l'objet se présente sous forme de tubes simples. La méthode coupe par coupe est grandement facilitée par une juxtaposition décalée des plans parallèles de contours successifs. De plus, par simple cliquage de chacun des contours sur plusieurs coupes successives, la surface passant par tous ces contours est créée. Grâce à gOcad, non seulement des surfaces complexes comme des embranchements, des bifurcations entre deux ou plusieurs canalicules peuvent être modélisées mais aussi des structures ré-entrantes comme une représentation surfacique d'un tubule fusionnant dans une capsule.

La reconstruction de surfaces entre des coupes sériées est basée sur une méthode de triangulation. Cette technique essentielle dans la modélisation informatique de structures participant à la formation des tubules et canaux mésonéphritiques permet :

- de former un canalicule,
- de modifier éventuellement des portions de surface constitutives des canalicules,
- d'estimer le volume du canalicule, sa surface et sa longueur.

2.3.3.2. La résolution de différents cas de figures

Dans la reconstruction des tubules mésonéphritiques, trois formes ont été rencontrées :

- le simple tube où un contour correspond à un autre contour. Les atomes, appartenant aux lignes polygonales des contours qui se correspondent, participent à la réalisation de facettes triangulaires grâce à la méthode de triangulation (Figure 38a-d).
- des embranchements où au moins un contour se raccorde avec n contours (Figure 39a-e).
- des structures ré-entrantes où une connexion tubulaire fusionne avec les bords d'une capsule (Figures 40a-c). Ce cas ne s'observe qu'au niveau des extrémités externes des tubules mésonéphritiques de l'embryon humain de 7 semaines d'âge, exposé dans la Figure 50, là où apparaît une structure particulière, multi-vésiculaires.

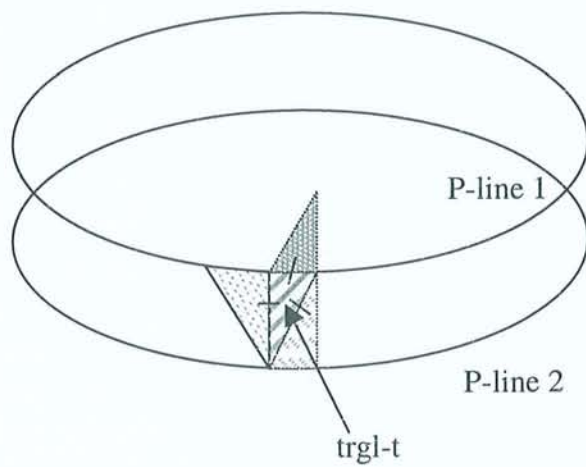


Figure 36 : Schéma de la structure d'un triangle *trgl-t*.

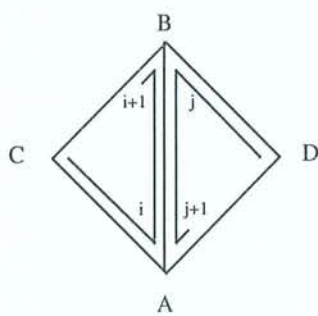


Figure 37 : Orientation des triangles *trgl-t*.

2.3.3.3. *Les améliorations dans la réalisation des reconstructions*

Mais l'utilisation de GOCAD demande une certaine rigueur et du discernement pour faire les « bons » choix de connexions entre les contours.

La rapidité

gOcad offre la possibilité de réaliser une structure tubulaire à partir d'un grand nombre de contours successifs en une seule manipulation. L'identification d'un tube est facilitée par la juxtaposition de différents contours. Une fois les contours discrétisés, ils sont désignés par simple cliquage, et la surface passant par ceux-ci est créée. Cette procédure peut s'effectuer sur plus de trente coupes sériées. La surface tubulaire créée peut être lissée par l'interpolateur de lissage qui est présenté dans le paragraphe 2.3.3.4. Ce lissage nécessite de conserver les atomes des contours extrêmes ou *control nodes*. Ensuite, une vue de la partie de l'objet reconstruit est ainsi obtenue.

La complexité

Lorsqu'un ou plusieurs tubule(s) se connecte(nt) avec au moins deux tubules, déterminer la morphologie de la structure demande de visualiser l'ensemble des contours de la zone étudiée. Celle-ci offre une représentation approximative indispensable pour augmenter la netteté de la structure envisagée et pour progresser dans sa perception. Le temps consacré pour résoudre des connexions plus ou moins complexes est du au choix des contours à connecter et non dans la réalisation de la surface. Pour composer cette structure surfacique, il suffit de désigner les contours constitutifs de la connexion intertubulaire.

La précision

Grâce au maillage des surfaces, il est possible de découper des portions reconstruites non satisfaisantes afin d'effectuer une nouvelle tentative de reconstruction. Ce découpage peut se faire triangle par triangle ou encore par portion de surface. Ceci constitue un des avantages de la modélisation surfacique.

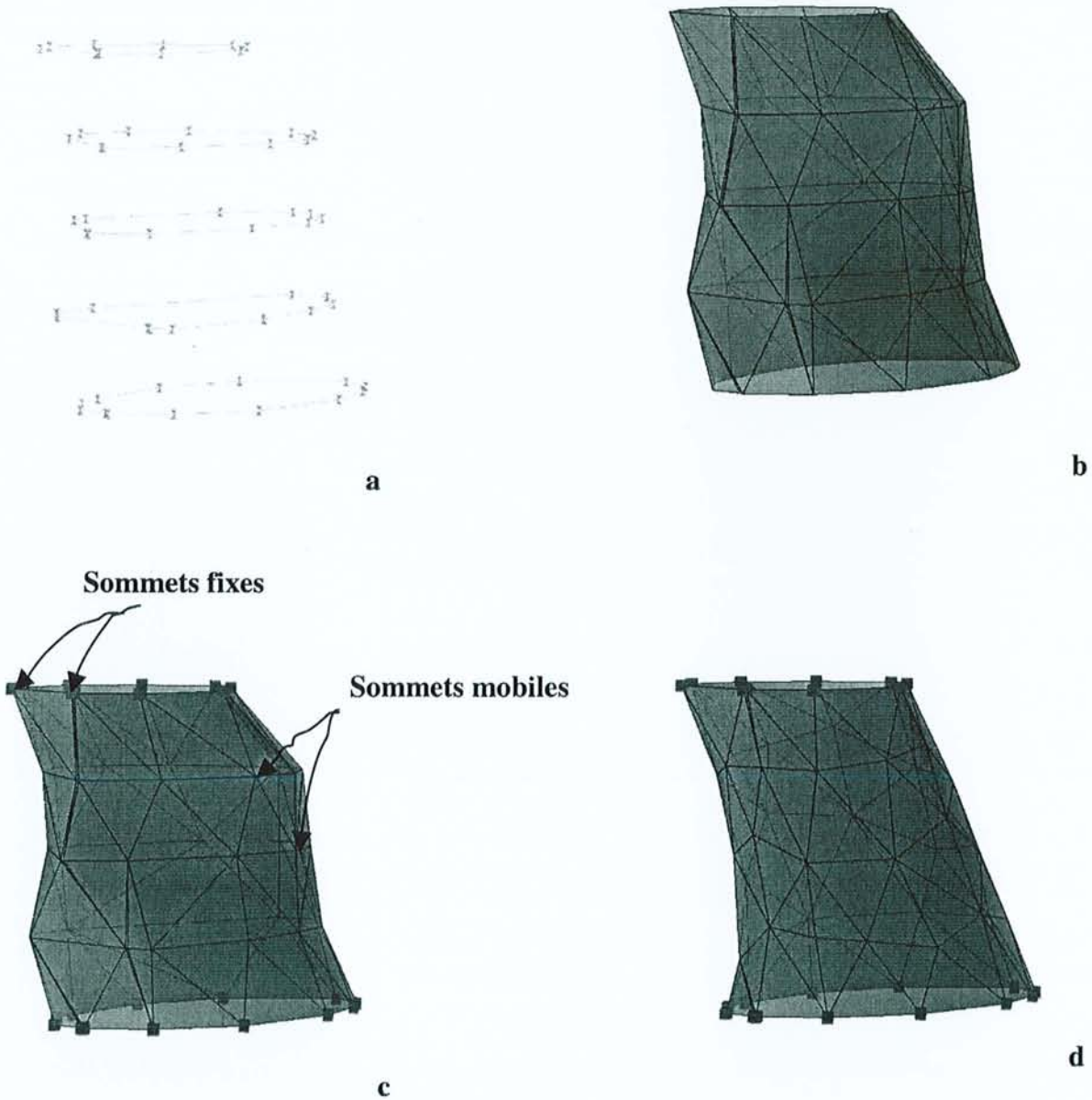


Figure 38: Reconstruction d'un simple tubule.

(A partir de plusieurs contours successifs (a), la surface d'un tubule peut être formée par remplissage sous forme de facettes triangulaires (b). Les figures (c) et (d) présentent l'effet de correction du lissage qui s'effectue par un déplacement de certains sommets avec immobilisation d'autres)

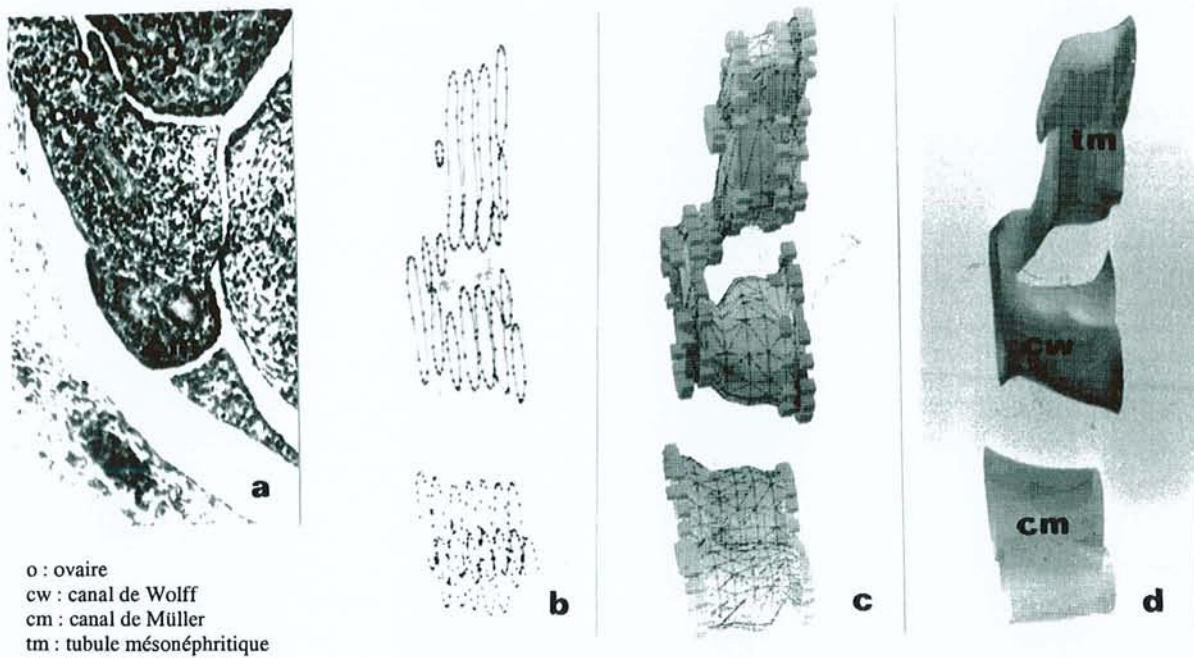


Figure 39 : Représentation schématique de la reconstruction à partir de coupes histologiques sériées.

(A partir de coupes histologiques sériées (a), les différents contours tracés, numérisés et digitalisés sont pré-visualisés dans leur ensemble. Ces 7 coupes successives facilement mobilisées (b) permettent d'envisager les correspondances tubulaires et de procéder ensuite à la phase de triangulation au niveau des embranchements repérés(c). Puis un lissage s'effectue par déplacement de certains sommets et par fixation d'autres (d et e)).

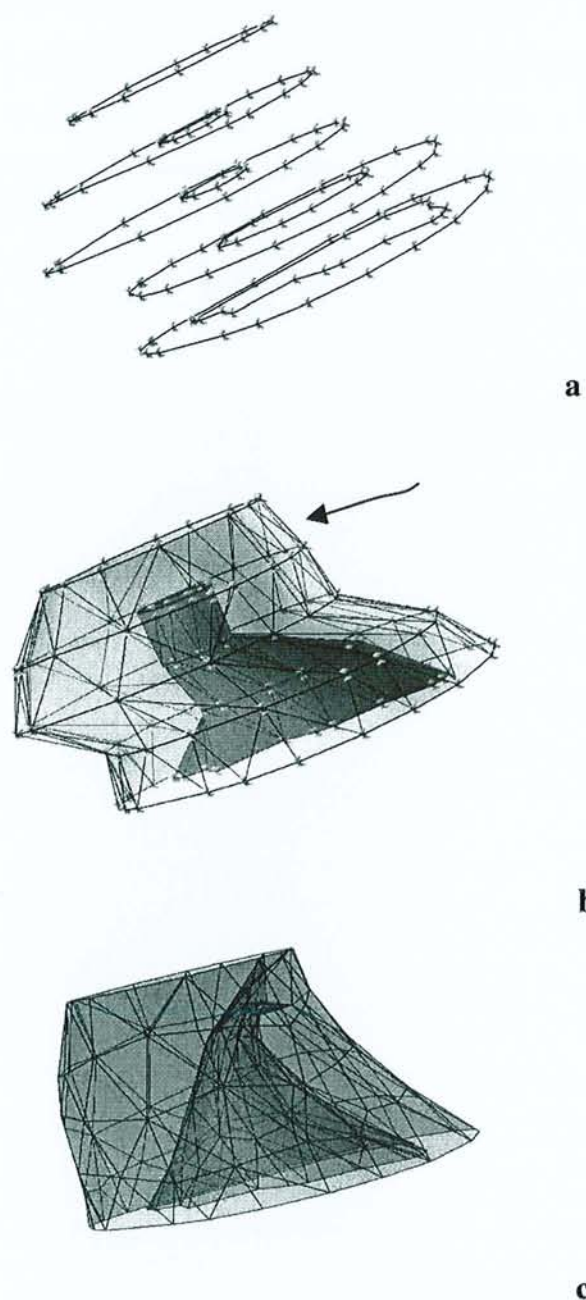




Figure 40 : Schématisation de la reconstruction d'une surface ré-entrante.

(A partir de plusieurs contours successifs (a), la surface du tubule interne (b) et externe sont formées par remplissage de facettes triangulaires. La portion manquante est ensuite créée (c).

La proximité

Le réseau tubulaire mésonéphritique devient rapidement complexe surtout dans la portion la plus rostrale à proximité de la région gonadique. Il peut apparaître un type de structure imbriquée entre deux coupes comme, par exemple, un simple tubule qui s'emboîte dans un embranchement. Il se constitue alors un chevauchement qui masque le tubule partiellement ou totalement. Ce recouvrement artefactuel peut être corrigé par deux moyens :

- le premier est un lissage ciblé de la zone d'imbrication libérant un espace par déplacement contrôlé des *fuzzy control nodes*, ceci est le plus souvent d'une efficacité immédiate (Figure 41),
- le second est de modifier le maillage de la surface par modification de la topologie ( ou ) jusqu'à la disparition du chevauchement des deux surfaces en utilisant le lissage.

2.3.3.4. Le lissage

La modélisation de surfaces par triangulation fournit des approximations qui ne sont pas suffisamment régulières pour approcher les structures anatomiques 3D réelles. Ces irrégularités sont dues à des problèmes techniques lors de la préparation histologique :

- une distorsion tissulaire due à des différences d'osmolalité au cours des bains de déshydratation et d'hydratation des tissus (Jones *et al*, 1994 [43]),
- une compression lors de la confection des coupes entraînant une variabilité dans l'épaisseur des coupes,
- un voilage ou un pliage des coupes lors de leur collage avec l'eau albumineuse sur la plaque chauffante,
- et une perte partielle du tissu lors de l'étalement par étirement des extrémités du ruban de coupes sériées.

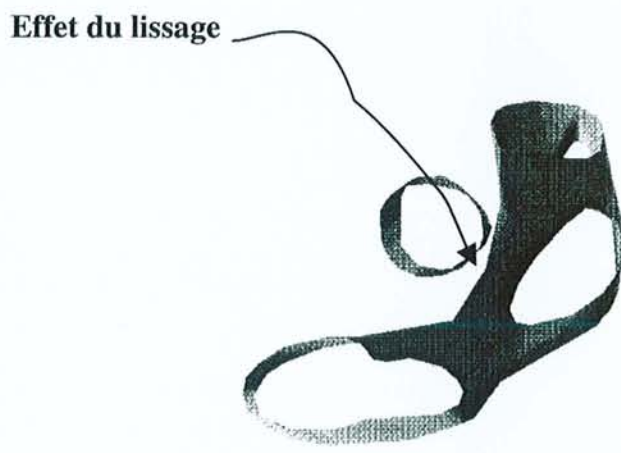
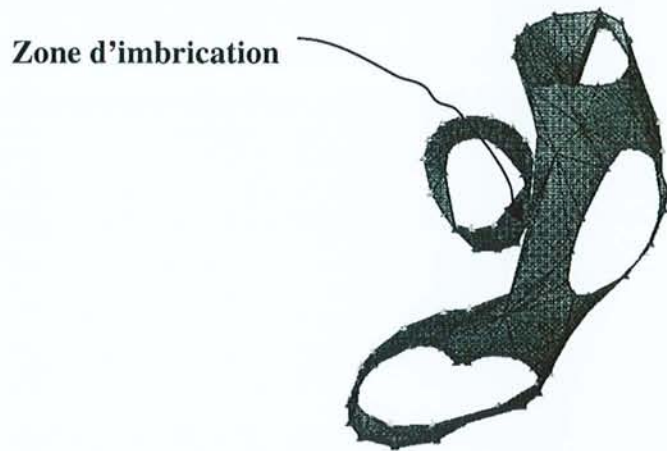


Figure 41 : Zone d'imbrication entre la surface d'un simple tubule et celle d'un embranchement de 3 tubules (a), suivi de l'effet du lissage sur cette zone (b).

Aux irrégularités rencontrées au cours de ces différentes manipulations, s'ajoutent celles générées par la méthode de la triangulation. Par exemple, lors de la formation des embranchements, de petites érosions latérales et bosselées peuvent apparaître. Pour pallier à l'un ou l'autre de ces aspects, la qualité de la surface est améliorée grâce à l'utilisation d'un interpolateur qui réorganise géométriquement la place des sommets des triangles. Cette méthode appelée DSI (Discrete Smooth Interpolation), dont le but premier est de résoudre les artefacts générés par la juxtaposition de surfaces triangulaires a été définie et généralisée dans le cadre d'applications de modélisation géométrique (Mallet, 1992 [66]).

Des points dont la position est sûre appartenant à une *T-surf* ne doivent pas être affectés par le lissage. Ces points fixes, appelés *control nodes*, sont caractérisés par un champ de déplacement nul. La position fixe de ces points garantit l'indéformabilité globale de l'objet.

Par contre, les autres points peuvent bouger dans l'espace et participent au lissage : ce sont les *fuzzy-control nodes*. Ces derniers ont une position connue avec un coefficient de certitude. Tout se passe comme si le nœud était attaché au point de coordonnées (x, y, z) par un ressort, dont le coefficient d'élasticité est proportionnel au coefficient de certitude.

Effectivement, au cours du lissage, les *fuzzy-control nodes* ont un champ de déplacement contrôlé. La forme et la taille de l'objet sont ainsi préservées et ne sont pas affectées par le traitement de surfaces. Les *control nodes* peuvent être appliqués aux atomes placés sur les *P-lines* mais pas sur les nœuds intermédiaires créés lors de la triangulation. Dans le cas de la reconstruction des tubules et canaux mésonéphritiques, la garantie de son indéformabilité peut être abordée par deux méthodes :

- La première méthode consiste à faire disparaître, dans un premier temps, tous les *control nodes*, pour ne les replacer dans un second temps qu'en des positions stratégiques sur les atomes des *P-lines* :
 - soit au niveau des bifurcations,
 - soit au niveau des extrémités ouvertes des canalicules mésonéphritiques.

Cette méthode s'applique pour des lissages plus modérés où le résultat attendu se pratique plus localement.

- La deuxième méthode revient à rassembler toutes les surfaces des coupes successives appartenant à un même élément tubulaire. Ensuite, seules sont conservées comme positions sûres celles des bordures des extrémités ouvertes des canalicules.

Cette dernière méthode est avantageuse dans le cas de simple tubule.

Dans les deux méthodes, tous les atomes non affectés d'un *control node* sont considérés comme des *fuzzy control nodes*, et subissent l'algorithme de lissage. L'observateur peut affecter le coefficient de pondération qu'il estime le plus proche de la forme anatomique.

2.3.3.4.1. L'interpolation DSI sur courbes

La compréhension du mécanisme de DSI, est favorisée dans le cas d'une courbe en 2D ou 3D. Il s'agit d'un algorithme qui permet le lissage des objets en diminuant en fait la rugosité de ceux-ci. Il peut-être aussi bien utilisé dans le cas 2D (une courbe ou un polygone) que dans le cas 3D (courbes, surfaces, volumes ou propriétés physiques).

L'interpolateur utilise la topologie associée à un objet quelque soit sa géométrie. La topologie est constituée des relations de voisinage qui existent entre les atomes définissant la géométrie de l'objet.

Ainsi pour une courbe en 2D ou 3D, généralement un atome a 2 voisins sauf les atomes extrêmes qui en ont qu'un seul.

Pour une surface, généralement un atome possède 4 à 8 voisins selon la triangulation effectuée. Par exemple, pour un carré, sa topologie peut varier de la façon suivante (Figure 42).

La rugosité d'une courbe se définit soit au niveau local d'une courbe, soit globalement sur toute la courbe.

Pour des commodités d'explications, l'exemple proposé est pris sur une courbe Ψ quelconque, contenant un ensemble de points $\Psi(\alpha)$, dont quelques-uns sont supposés fixés et appelés *control nodes* (Figure 43). L'écriture mathématique caractéristique de cette courbe est :

$$\Psi = [\Psi(1), \Psi(2), \dots, \Psi(k), \dots, \Psi(N)]$$

L'expression de la rugosité locale $R(\Psi/k)$ est la suivante :

$$R(\Psi/k) = \frac{|\Psi(k) - \frac{\Psi(k-1) + \Psi(k+1)}{2}|^2}{2}$$

Cela revient au calcul du carré de la distance entre le nœud k et le barycentre de ses voisins. En considérant la courbe précédente, la rugosité locale peut être schématiquement représentée comme dans la Figure 44.

La rugosité peut alors être définie sur tous les secteurs de la courbe Ψ . La notion de rugosité globale de la courbe peut être définie en faisant la somme des rugosités locales, selon l'expression suivante :

$$R(\Psi) = \sum_{k=1}^N R(\Psi/k)$$

La rugosité globale est équivalente à la somme des rugosités locales aux points $\Psi(k)$ pour k allant de 1 à N .

Si on diminue la rugosité locale au nœud $\Psi(k)$, alors la rugosité locale des nœuds voisins $\Psi(k-1)$ et $\Psi(k+1)$ va varier. Donc le lissage d'une courbe ne passe pas par une diminution locale de la rugosité, mais plutôt par une minimisation de la rugosité globale $R(\Psi)$. Pour cela, certaines contraintes dans l'objectif de l'algorithme de lissage doivent être définis :

- respecter la position des *control nodes* choisis à l'avance par l'utilisateur,
- respecter la forme générale de l'objet,
- minimiser la rugosité globale $R(\Psi)$.

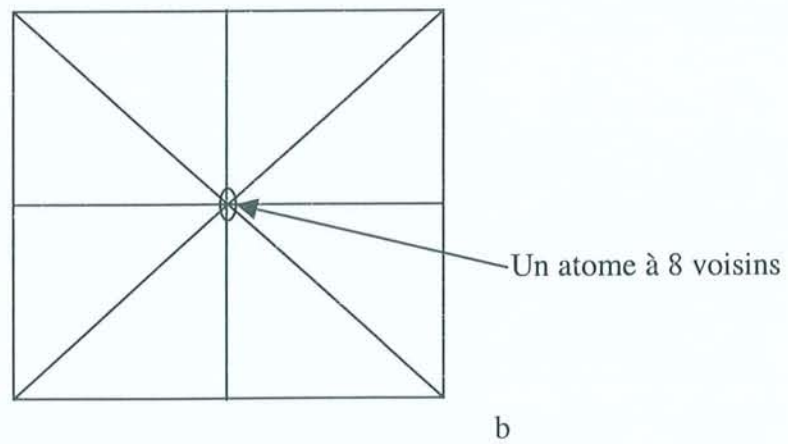
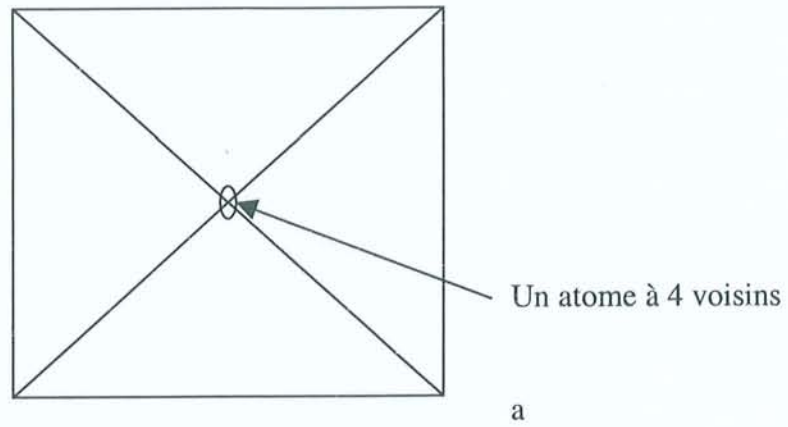


Figure 42 : Exemple de topologies possibles pour un carré : 1 atome avec 4 voisins (a), ou 1 atome avec 8 voisins (b).

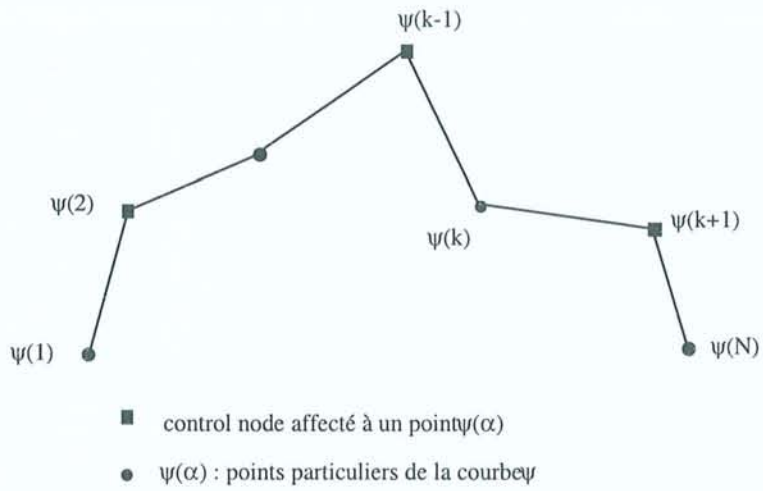


Figure 43 : Portion de la courbe Ψ d'un contour discrétisé.

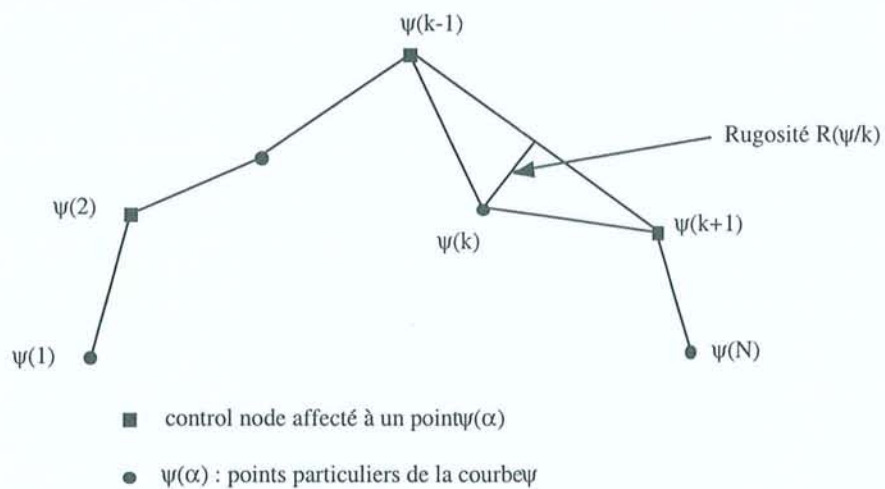


Figure 44 : Schématisation de la rugosité d'une portion de courbe.

2.3.3.4.2. Le lissage au sens DSI sur les courbes

Si on prend une nouvelle courbe Ψ de départ (Figure 45a) à laquelle on applique l'algorithme DSI sans y porter de *control nodes*, ou de contraintes de forme, on obtient alors une courbe Ψ' s'apparentant à une droite horizontale (Figure 45b),

$$\text{avec } R(\Psi) > R(\Psi') \text{ mais } R(\Psi') = 0$$

Si on impose à une autre courbe Ψ une contrainte de forme, par exemple, en fixant les 2 *control nodes* extrêmes. On obtient alors une nouvelle courbe Ψ' où chaque *fuzzy control node* relié à leur position d'attache par un ressort fictif donnera un aspect plus lisse à la nouvelle courbe Ψ' (Figure 45c),

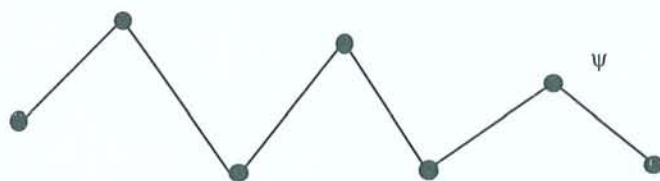
$$\text{avec } R(\Psi) > R(\Psi') \text{ et un aspect plus lissé de } \Psi'.$$

Si on impose une contrainte de forme par celle de la position des *control nodes*, alors seuls les *fuzzy control nodes* en position interne pourront subir un lissage.

2.3.3.4.3. Le lissage au sens DSI sur les réseaux 3D

En fait, l'algorithme s'applique dans un espace multidimensionnel sur un réseau de points interconnectés. Celui-ci est indépendant de la nature du réseau, à savoir :

- une courbe polygonale,
- une surface triangulée,
- un volume maillé par des tétraèdres.



a



b



c

Figure 45 : Ψ' courbe lissée de Ψ , sans *fuzzy control nodes* (a,b), avec *fuzzy control nodes* (c).

Seul la topologie de l'objet est à prendre en compte, c'est à dire le voisinage de chaque point.

Comme pour l'exemple de la courbe, la rugosité en un nœud k d'une surface S triangulée se définit de la façon suivante : $R(\Psi/k)$ est égale à la distance au carré entre le nœud $\Psi(k)$ et le barycentre des nœuds connectés au nœud k .

Si on prend une surface triangulée S dont les nœuds sont identifiés de la façon suivante (Figure 46) :

On note $\lambda(k)$ l'ensemble des nœuds connectés au nœud k

et $|\lambda(k)| =$ nombre de nœuds de $\lambda(k)$

On définit le barycentre $\Psi'(k)$ des nœuds connectés au nœud k de la façon suivante :

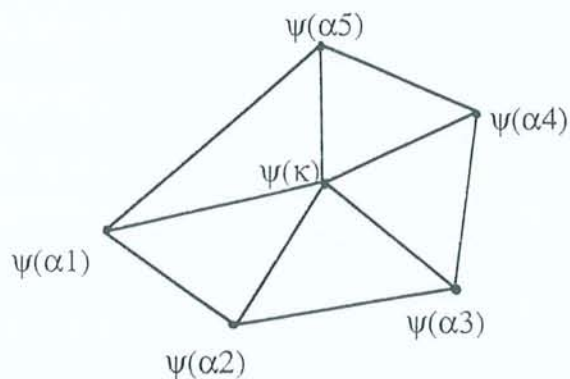
$$\Psi'(k) = \frac{1}{|\lambda(k)|} \sum_{\alpha \in \lambda(k)} \Psi(\alpha)$$

C'est à dire, que les coordonnées du barycentre $\Psi'(k)$ sont égales à la somme des coordonnées des points α , rapportées au nombre des points α contenus dans l'ensemble $\lambda(k)$.

Alors la rugosité de la surface S est égale au carré de la distance séparant les nœuds $\Psi(k)$ et $\Psi'(k)$. L'expression de la rugosité d'une surface S s'écrit de la façon suivante :

$$R(\Psi/k) = \|\Psi(k) - \Psi'(k)\|^2$$

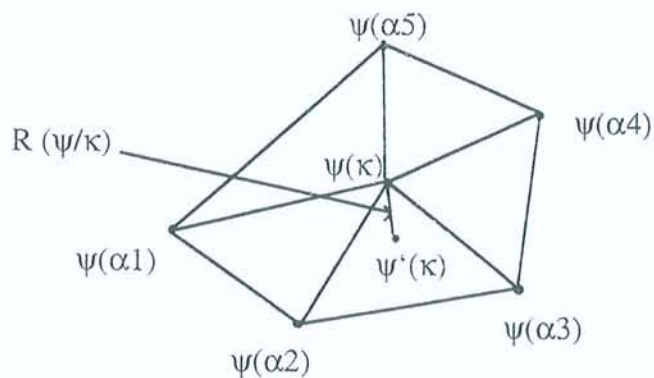
et se représente de la façon suivante visible dans la Figure 47.



Cas d'une surface triangulée S avec

- $\psi(\kappa)$ le noeud
- et les noeuds connectés au noeud $\psi(\kappa)$

Figure 46 : Ensemble de noeuds connectés au noeud k dans le cas d'une surface triangulée.



La notion de rugosité $R(\psi/\kappa)$ dépend

- $\psi(\kappa)$ le noeud
- le barycentre des noeuds connectés au noeud k : $\psi'(\kappa)$

Figure 47 : Représentation de la rugosité dans le cas d'une surface triangulée.

2.4. L'infrastructure informatique (Tableau 10)

Les reconstructions 3D obtenus ont nécessité d'utiliser 4 types de machine : Macintosh, PC, Silicon Graphics et Sun. En plus de matériel performant, le personnel encadrant est à l'écoute des demandes, que ce soit pour les besoins en logiciel (par ex : SAS/ASSIST), ou que ce soit pour des conseils d'utilisation.

Pour modéliser les objets à reconstruire, le cheminement est le suivant :

Tableau 10 : Présentation des différents outils informatiques utilisés

	HARDWARE	SOFTWARE
SEGMENTATION	Scanner <i>SUN Solaris</i> Mémoire vive : 64 Mo	Scan avec une résolution à 600dpi (fichier.tiff)
DISCRETISATION	Macintosh Performa 5200 <i>Système 7.5.3</i> Mémoire vive : 16 Mo	Adobe Photoshop TM 1.0.7 (correction d'images) ScanDigit
MODELISATION et prise de données numériques	Silicon Graphics <i>IRIX 5.3</i> Mémoire vive : 64 Mo Vitesse de travail : SPEC int92 : 140.7 SPEC fp92 :142.7	gOcad
RENDU VISUEL pour une observation et une mobilisation rapide et complète de l'objet modélisé	Silicon Graphics <i>IRIX 6.2</i> Mémoire vive : 128 Mo Vitesse de travail : SPEC int95 : 11 SPEC fp95 : 18	gOcad
RENDU VISUEL pour des prises photographiques	Silicon Graphics <i>IRIX 6.2</i> Mémoire vive : 128 Mo Vitesse de travail : SPEC int95 : 11 SPEC fp95 : 18 Macintosh Performa 5200 <i>Système 7.5.3</i> Mémoire vive : 16 Mo Imageur ou « Flasheur de diapositives »	gOcad pour la visualisation des modèles reconstruits Capture pour les prises de clichés photographiques (fichier .rgb) Adobe Photoshop TM 1.0.7 pour arrangement des clichés Pom
SAISIE DES DONNEES NUMERIQUES	PC <i>Windows NT</i> Mémoire vive : 64 Mo	Excel Transformation par MSDOS des fichiers .xls en .dbf
ANALYSE STATISTIQUE	PC <i>Windows NT</i> Mémoire vive : 64 Mo	SAS/ASSIST version 6.08
Circulation des informations grâce au réseau		

3. RÉSULTATS

3.1. Reconstructions 3D des mésonéphros d'embryons humains

Les connaissances actuelles du rôle joué par le mésonéphros embryonnaire dans la formation des cônes efférents humains restent très peu définies. En fait, il est très difficile de clarifier l'aspect tridimensionnel des cônes efférents. La première raison s'apparente à un enroulement des cônes efférents sur eux-mêmes compliquant le discernement d'un cône efférent de son voisin. La seconde raison s'intègre dans le fait qu'ils se mettent en place dans un très petit espace où les extrémités sont difficilement identifiables.

De plus, les cônes efférents peuvent être confondus avec les canaux epididymaires parce qu'il est difficile de distinguer un changement au niveau de leur jonction et qu'il existe une grande variabilité individuelle. Chez l'homme, il a été dénombré 8 à 15 cônes efférents à partir d'observations histologiques (Stieve, 1930 cité par Saitoh et al, 1990 [106]). Six cônes efférents ont été visualisés grâce à une étude à partir de coupes sériées (Jonté and Holstein, 1987 [44]). De récents travaux viennent corroborer ces résultats, où 5 à 6 cônes efférents ont été reconstruits à partir des coupes histologiques sériées (Saitoh *et al*, 1990 [106]).

Ces cônes efférents très convolutés s'étendent jusque dans la gonade, en formant les canaux excréteurs du testicule, et proviennent de la persistance des tubules mésonéphritiques. Au cours de la 9^{ème} semaine, 5 à 12 tubules mésonéphritiques de la région épидидymaire se lient aux cordons du futur rete testis (Larsen, 1993 [58]). Ils constituent les canalicules efférents et réalisent la communication entre les tubes séminifères et le rete testis présomptif.

Dans ce travail, les mésonéphros d'embryons humains de stades 15, 17 et 19, respectivement 4, 6 et 7 semaines d'âge, ont été intégralement reconstruits, et leur reconstruction 3D surfacique exploitée par gOcad. Grâce à une forte puissance de travail (11SPEC int95, 18SPEC fp95), à une mémoire vive de 128 Mo disponible sur Silicon Graphics, et à une mobilisation de tout ou partie de l'objet, le dénombrement des tubules mésonéphritiques a été réalisé.

Le mésonéphros a été scindé en une portion rostrale et une portion caudale à partir du point d'intersection des 2 axes principaux du canal de Wolff à l'origine de la courbure du mésonéphros pour faciliter l'exploitation des informations (Tableau 11).

A partir des reconstructions obtenus, plusieurs types de tubules ont été recensés et leur répartition a été dressée dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Répartition numérique des différents tubules mésonéphritiques pour les 3 mésonéphros humains.

		Différents types de tubules mésonéphritiques							
		Lié au canal de Wolff				Non lié au canal de Wolff			
Stade	Situation	ET	ST	TC	TN	ET	ST	TC	TN
Stade 15	PR	12	5	5	7	8	3	5	0
	PC	11	7	4	4	16	9	7	7
	T	23	12	9	11	24	12	12	7
Stade 17	PR	10	1	3	9	13	5	8	3
	PC	14	5	8	9	14	0	14	9
	T	24	6	11	18	27	5	22	12
Stade 19	PR	18	12	0	6	18	14	4	1
	PC	1	0	1	1	0	0	0	0
	T	19	12	1	7	18	14	4	1

Abréviations :

Différents types de tubules mésonéphritiques :

ET : élément tubulaire

ST : simple tubule

TC : tubule ayant une capsule de Bowman

TN : tubule ayant l'aspect d'un néphron

Situation :

PR : tubules situés dans la portion rostrale du mésonéphros

PC : tubules situés dans la portion caudale du mésonéphros

T : total d'un même type de tubules

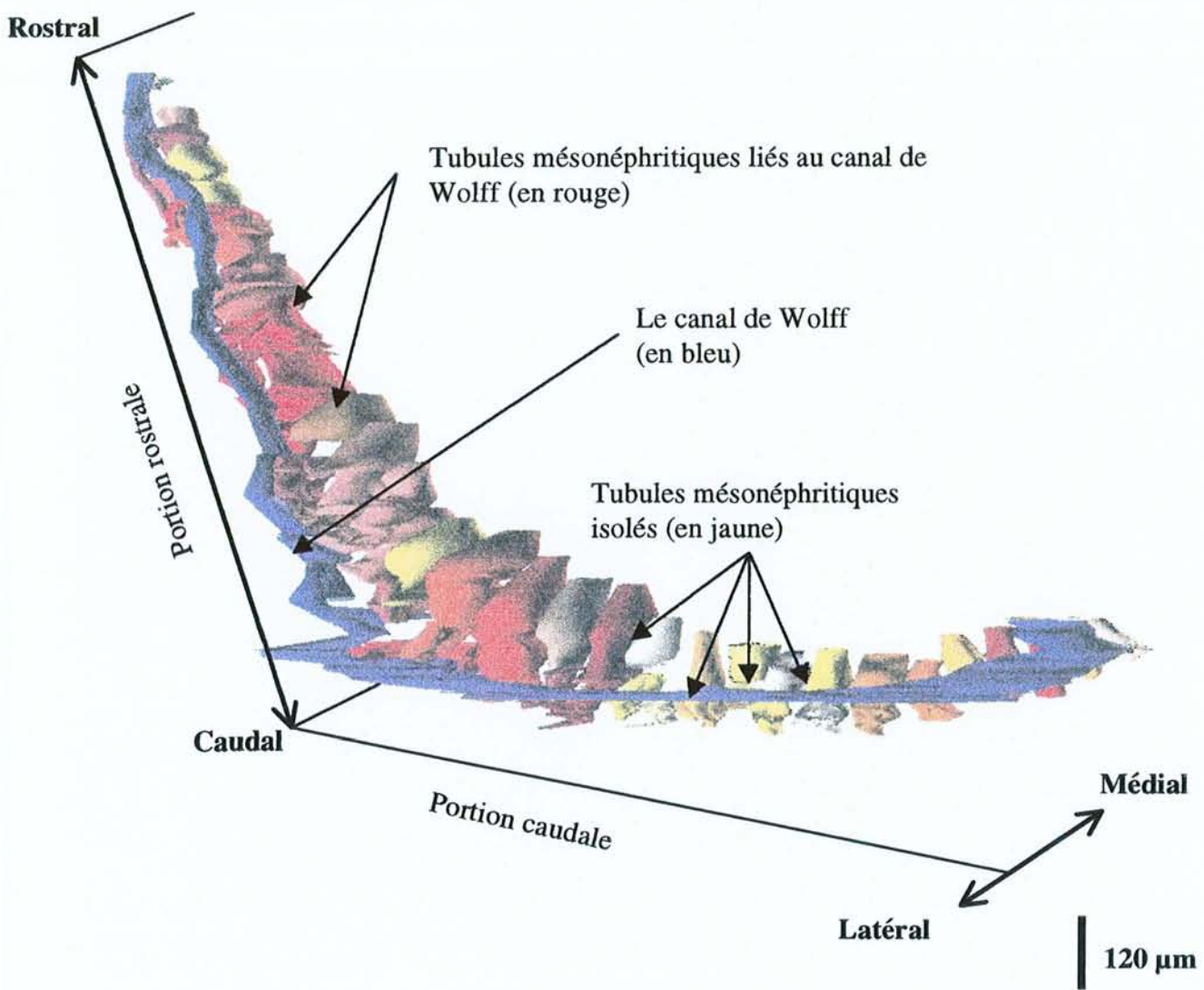


Figure 48 : Reconstruction 3D d'un mésonéphros droit de 1,55 mm d'un embryon humain de 4 semaines.

3.1.1. Reconstruction 3D d'un mésonéphros gauche de 1,55 mm d'un embryon âgé de 4 semaines (Figure 48)

Le mésonéphros reconstruit de stade 15 comporte 23 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff et 24 autres non liés (Tableau 11).

Les tubules liés se répartissent le long du canal de Wolff et sont visibles sur la Figure 48 en gris clair avec 12 éléments tubulaires dans la portion rostrale et 11 dans la portion caudale. Par contre, les unités néphriques complètement formées, liés au canal de Wolff, apparaissent au nombre de 7 dans la portion rostrale et de 4 dans la portion caudale.

Les tubules non liés se positionnent tout le long du canal de Wolff. La portion caudale possède un plus grand nombre d'éléments tubulaires que la région rostrale respectivement 16 et 8. De même, les unités néphriques complètes, non liées au canal de Wolff, s'observent uniquement dans la région caudale et sont au nombre de 7.

A ce stade dans la portion rostrale, les tubules liés sont plus nombreux, que les tubules non liés, 12 et 8 respectivement, alors que dans la portion caudale, ce sont les tubules non liés, au nombre de 16 pour 11 dans la portion rostrale, qui participent essentiellement à la structure du mésonéphros. De plus, sur les 23 tubules liés, 11 d'entre eux sont des néphrons complets ; le mésonéphros est donc dans une phase de différenciation.

Ces résultats montrent clairement que les tubules mésonéphritiques rattachés au canal de Wolff se développent d'abord rostralement puis caudalement, alors que les tubules mésonéphritiques isolés apparaissent plus caudalement.

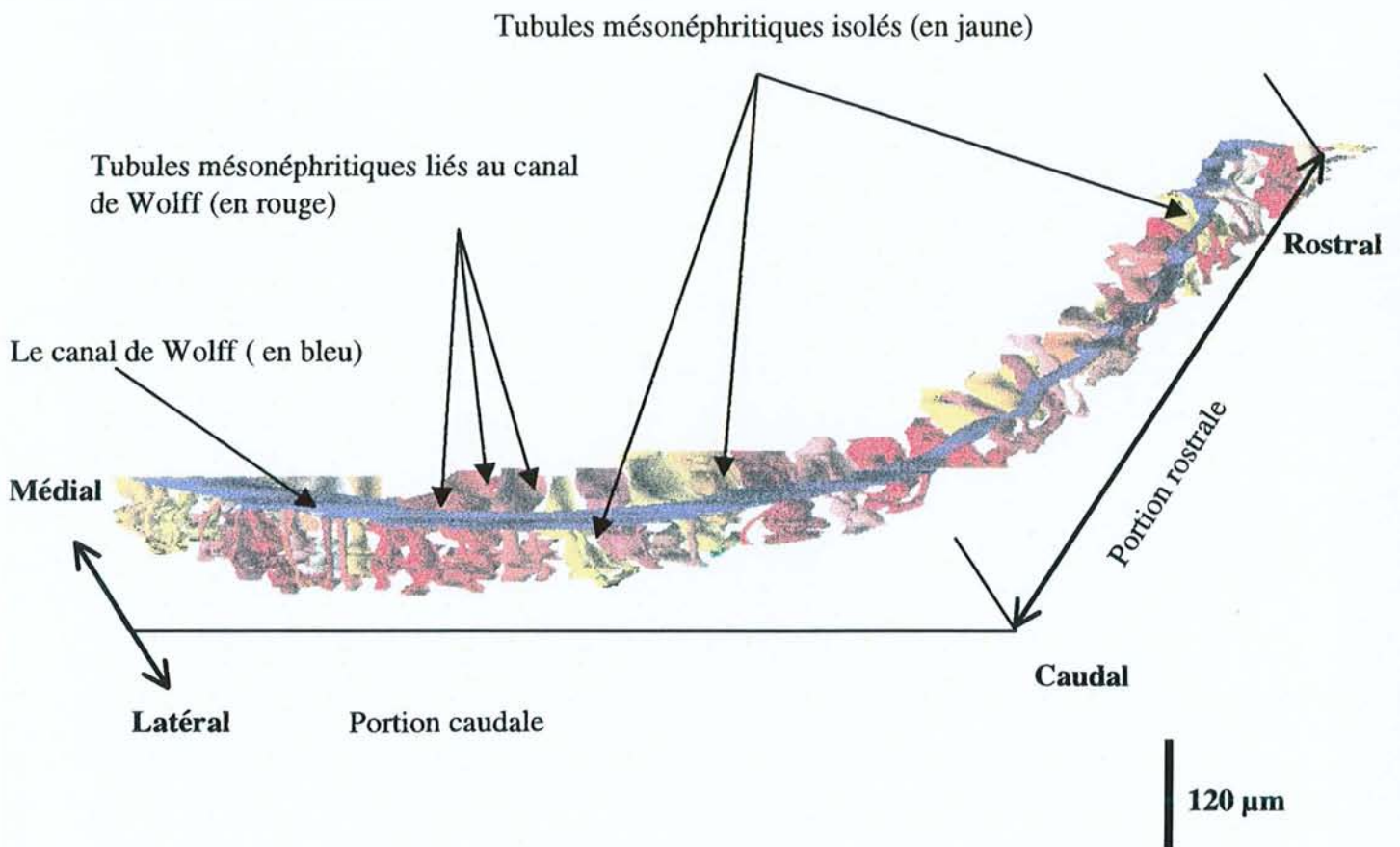


Figure 49 : Reconstruction 3D d'un mésonéphros gauche de 1,13 mm d'un embryon humain de 6 semaines.

3.1.2. Reconstruction 3D d'un mésonéphros droit de 1,13 mm d'un embryon mâle âgé de 6 semaines (Figure 49)

La visualisation du mésonéphros reconstruit de stade 17 révèle une structure compactée comme le présente la Figure 49. Ce mésonéphros est constitué de 24 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff et de 27 non liés (Tableau 11).

Les tubules liés sont moins nombreux dans la portion rostrale que dans la portion caudale, respectivement 10 et 14. Les unités néphriques complètes se répartissent en 9 unités rostrales et 9 unités caudales. Il est intéressant de noter qu'elles représentent plus des 2/3 des éléments tubulaires liés.

Les éléments tubulaires non liés se répartissent le long du canal de Wolff : 13 dans la portion rostrale et 14 dans la portion caudale. Les unités néphriques complètes non liés présentent toujours une localisation asymétrique : 3 néphrons complets rostraux et 9 caudaux.

Ainsi par rapport au stade 15, le nombre d'unités néphriques connectées au canal de Wolff passe de 11 à 18, alors que le nombre d'unités non connectées passe de 7 à 12.

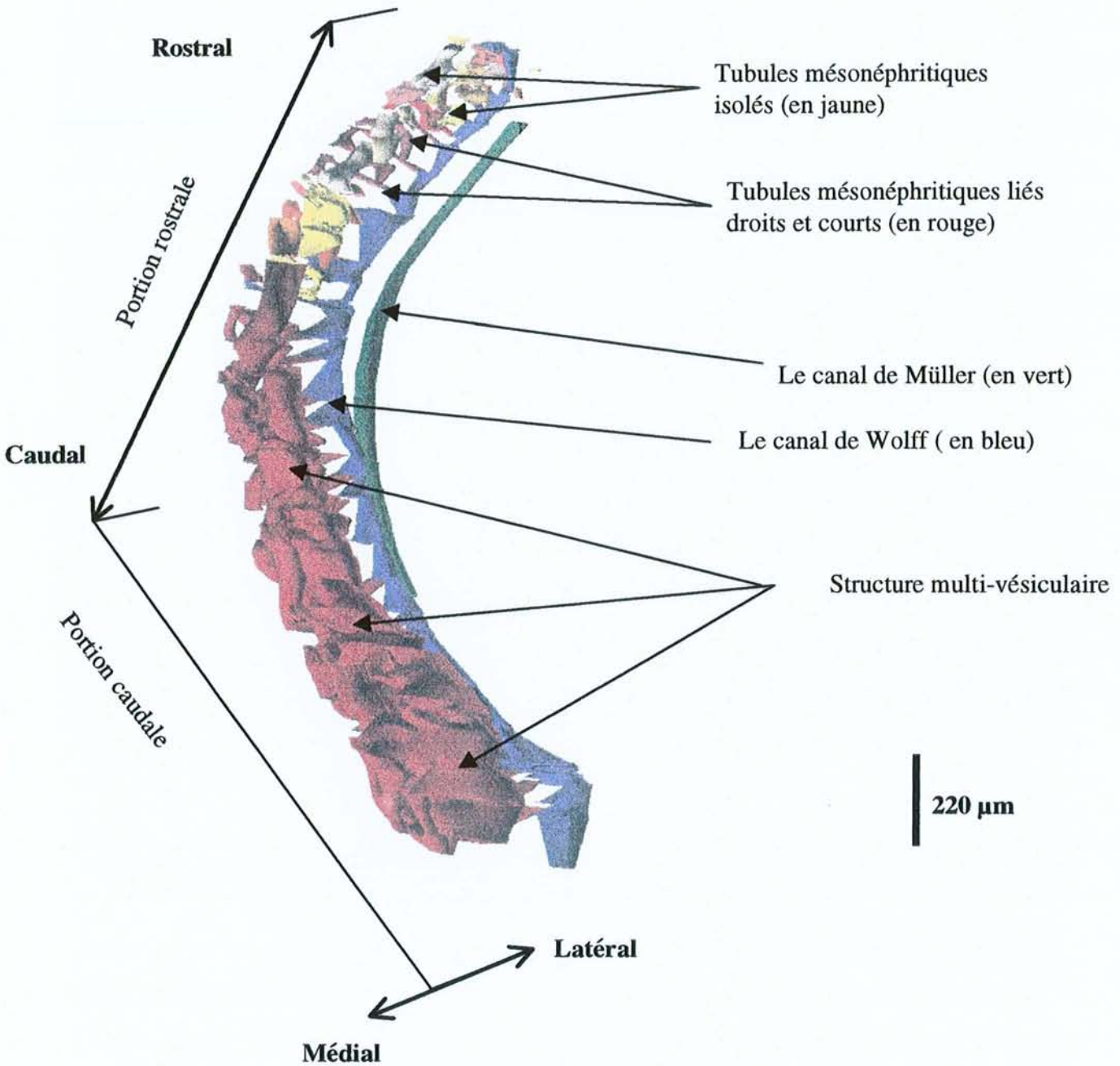


Figure 50 : Reconstruction 3D d'un mésonéphros gauche de 2,04 mm d'un embryon humain de 7 semaines.

3.1.3. Reconstruction 3D d'un mésonéphros droit de 2,04 mm d'un embryon femelle âgé de 7 semaines (Figure 50)

Le mésonéphros reconstruit de stade 19 est constitué de 19 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff et de 18 non liés (Tableau 11).

Les éléments tubulaires liés au canal de Wolff ont une répartition particulière. La portion rostrale est formée de 18 éléments tubulaires alors que la portion caudale n'en comporte qu'un seul. Ces éléments sont constitués par un ensemble de vésicules en formation associées les unes aux autres (Figure 50). Ces éléments multi-vésiculaires rejoignent le canal de Wolff par 16 connexions tubulaires et pourraient être caractéristiques du mésonéphros femelle. D'autre part, les tubules rostraux liés au canal de Wolff sont plus courts qu'aux stades précédents et ne comportent plus que 6 unités néphriques complètes.

Parmi les 18 éléments tubulaires non liés, 14 d'entre eux prennent la forme d'un tubule simple. Enfin, tous sont localisés dans la région rostrale.

Ces résultats montrent que l'ensemble des éléments tubulaires, liés ou non, se sont concentrés dans la portion rostrale du mésonéphros.

De plus, la structure multi-vésiculaires, localisée dans la portion caudale au stade 19, n'existait pas dans les mésonéphros aux stades 15 et 17.

3.1.4. Analyse morphométrique des mésonéphros

Les caractéristiques morphométriques de 12 unités néphriques des 3 mésonéphros humains reconstruits ont été abordées en suivant 3 paramètres qui sont la longueur, la surface et le volume.

3.1.4.1. Les méthodes de calcul

La longueur est la distance séparant deux points extrêmes choisis ; celle-ci est obtenue en calculant la norme du vecteur formé par ces deux points.

La surface est la somme de l'aire de chacun des triangles qui définit l'objet reconstruit (Figure 51).

Le volume est la somme des volumes associés à chacun des triangles de l'objet reconstruit. Le volume associé à un triangle est la portion de l'espace comprise entre ce triangle et sa projection sur le plan xoy (Figure 52).

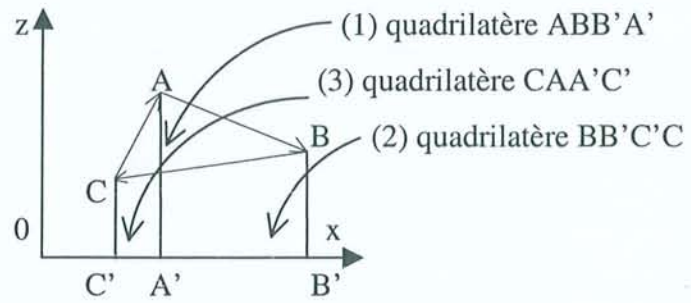
La Figure 51 montre comment calculer une surface à partir de 3 côtés. La surface ABC est égale à $(ABB'A') - (BCC'B') + (CAA'C')$. Les signes dépendent de l'orientation donnée au segment. Le calcul du volume se fera sur le même principe, en généralisant en 3D. L'orientation des triangles permet de définir des volumes soient positifs, soient négatifs.

3.1.4.2. Les données numériques

Pour chaque reconstruction, les mesures des paramètres ont été relevées uniquement sur deux néphrons de la portion rostrale et sur 2 autres néphrons de la portion caudale. Les néphrons étudiés ont été sélectionnés en prenant les 2 premières unités néphriques complètement formées dans chacune des portions. Cette sélection a été choisie pour 2 raisons. La première est l'existence d'un nombre différent d'unités néphriques complètes liées au canal de Wolff pour chaque stade étudié. La seconde est la formation dans le sens rostro-caudal des unités néphriques.

Par exemple, Ro1 et Ro2 sont les 2 premières unités néphriques entièrement constituées dans la portion rostrale du mésonéphros, et sont donc sélectionnées. Il en est de même avec Ca1 et Ca2 dans la portion caudale.

Toutes les mesures effectuées sont présentées dans les tableaux 12 à 14.



(1) - (2) + (3) = la surface du triangle ABC

Figure 51 : Méthode de calcul d'une surface à partir de 3 segments (AB, BC, CA).

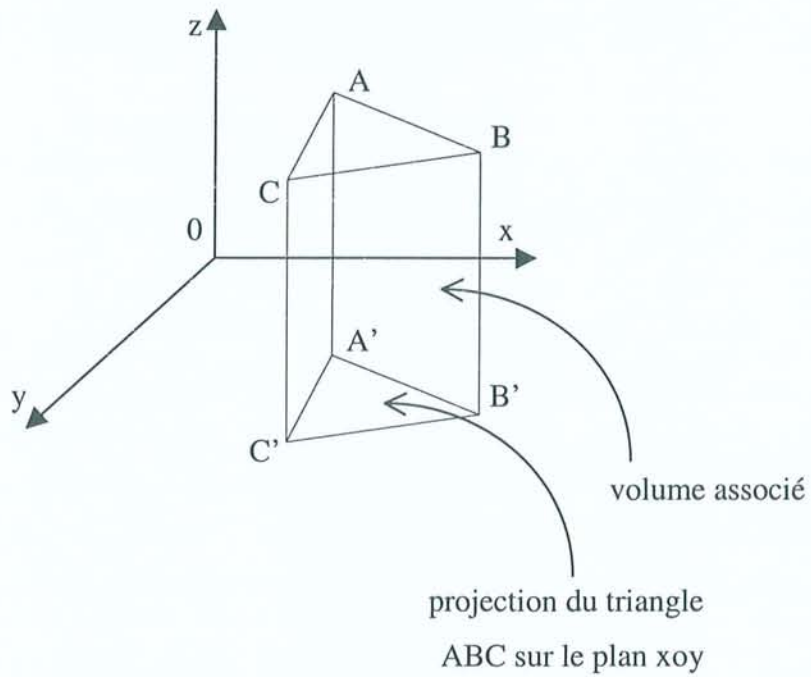


Figure 52 : Représentation du volume associé de la surface d'un triangle ABC et de sa projection sur le plan xoy.

Tableau 12 : Longueurs de chacune des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux.

		Longueurs de chacune des parties constitutives des néphrons choisis (μm , %)							
		Ro1		Ro2		Ca1		Ca2	
Stades	Parties	μm	%	μm	%	μm	%	μm	%
Stade 15	B	129	24	101	29	245	43	155	70
	P1	60	11	115	33	98	17	35	16
	D1	134	25	131	38	224	40	31	14
	P2	126	24						
	D2	87	16						
	<i>Total</i>	<i>536</i>		<i>347</i>		<i>567</i>		<i>221</i>	
Stade 17	B	199	32	143	33	141	33	141	21
	P1	137	22	169	39	188	44	222	33
	D1	176	28	125	28	97	23	166	25
	D2	118	18					144	21
	<i>Total</i>	<i>630</i>		<i>437</i>		<i>426</i>		<i>673</i>	
Stade 19	B	109	32	70	27				
	P1	64	19	56	21				
	D1	166	49	135	52				
	<i>Total</i>	<i>339</i>		<i>261</i>					

Abréviations :

- Ro1 : le 1^{er} néphron complet dans la portion rostrale,
- Ro2 : le 2^{ème} néphron complet dans la portion rostrale,
- Ca1 : le 1^{er} néphron complet dans la portion caudale,
- Ca2 : le 2^{ème} néphron complet dans la portion caudale,
- B: sa capsule de Bowman,
- P1: 1^{er} tubule proximal,
- P2 : 2^{ème} tubule proximal,
- D1 : 1^{er} tubule distal,
- D2 : 2^{ème} tubul distal.

Tableau 13 : Surfaces de chacune des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux.

		Surfaces de chacune des parties constitutives des néphrons choisis (μm^2 , %)							
		Ro1		Ro2		Ca1		Ca2	
Stades	Parties	μm^2	%	μm^2	%	μm^2	%	μm^2	%
Stade 15	B	3750	41	4280	58	18900	66	5850	78
	P1	890	10	2060	28	2500	9	750	10
	D1	1280	14	1060	14	7000	25	900	12
	P2	2670	29						
	D2	600	6						
	<i>Total</i>		<i>9190</i>		<i>7400</i>		<i>28400</i>		<i>7500</i>
Stade 17	B	5360	53	4770	59	6740	79	7360	48
	P1	2270	22	2630	33	1030	12	5790	38
	D1	1860	18	620	8	720	8	1130	8
	D2	700	7					990	6
	<i>Total</i>		<i>10190</i>		<i>8020</i>		<i>8490</i>		<i>15270</i>
Stade 19	B	1690	41	1010	35				
	P1	1360	33	1000	35				
	D1	1120	27	840	30				
	<i>Total</i>		<i>4170</i>		<i>2850</i>				

Tableau 14 : Volumes de chacune des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux.

		Volumes de chacune des parties constitutives des néphrons choisis (μm^3 , %)							
		Ro1		Ro2		Ca1		Ca2	
Stades	Parties	μm^3	%	μm^3	%	μm^3	%	μm^3	%
Stade 15	B	15420	25	9900	40	10720	60	5400	63
	P1	1350	2	970	4	4290	24	1730	20
	D1	440	1	14000	56	2970	16	1390	17
	P2	33200	53						
	D2	12100	19						
	<i>Total</i>		<i>62510</i>		<i>24870</i>		<i>17980</i>		<i>8520</i>
Stade 17	B	1100	3	13810	50	26820	78	1800	20
	P1	11120	29	12770	46	7440	21.5	6630	72
	D1	20860	54	1270	4	140	0.5	600	6
	D2	5530	14					170	2
	<i>Total</i>		<i>38610</i>		<i>27850</i>		<i>34400</i>		<i>9200</i>
Stade 19	B	8250	71	2430	52				
	P1	540	5	260	5				
	D1	2830	24	2070	43				
	<i>Total</i>		<i>11620</i>		<i>4760</i>				

3.1.4.3. Evolution des paramètres longueur, surface et volume des parties constitutives de 2 néphrons rostraux et caudaux

3.1.4.3.1. Les néphrons dans la portion rostrale (Figure 53)

Les mesures de longueur montrent un allongement des néphrons entre le stade 15 (536 μm et 347 μm) et le stade 17 (630 μm et 437 μm), alors qu'au stade 19, les néphrons ont largement régressé (339 μm et 261 μm). L'histogramme 1A de la Figure 54 révèle que pour les 2 unités rostrales (Ro1 et Ro2), les longueurs des capsules de Bowman et des tubules proximales augmentent du stade 15 à 17.

Les mesures de surfaces progressent du stade 15 à 17, au niveau de la capsule de Bowman et du premier tubule proximal pour chuter au stade 19 (1B ; Figure 53).

L'histogramme 1C montre au stade 17 deux aspects différents d'une unité néphrique rostrale : l'une a une capsule de Bowman peu volumineuse avec un tubule distal qui dépasse les 20000 μm^3 , alors que celle dont la capsule de Bowman atteint les 15000 μm^3 présente un petit tubule distal de 2000 μm^3 .

3.1.4.3.2. Les néphrons dans la portion caudale (Figure 54)

Les mesures de longueur montrent un certain développement des néphrons du stade 17 (426 μm et 673 μm) par rapport à ceux du stade 15 (567 μm et 221 μm) sans toutefois permettre de les distinguer nettement. Les différentes parties des 2 unités néphriques caudales ont des longueurs élevées avoisinant les 200 μm (2A ; Figure 54), par contre les mesures de surfaces et de volumes restent faibles sauf pour les capsules de Bowman (2B et 2C ; Figure 55).

3.1.4.3.3. Conclusion (Figures 53 et 54)

Pour les néphrons de la portion rostrale et caudale, le stade 17 représente un stade de maturation alors que le stade 19 se trouve en déclin. Que les unités soient rostrales ou caudales, les histogrammes des paramètres de longueur (1A-2B) et de surface (1B-2B) ont le même profil, ce qui n'est pas le cas pour les histogrammes de l'évolution du volume (1C-2C).

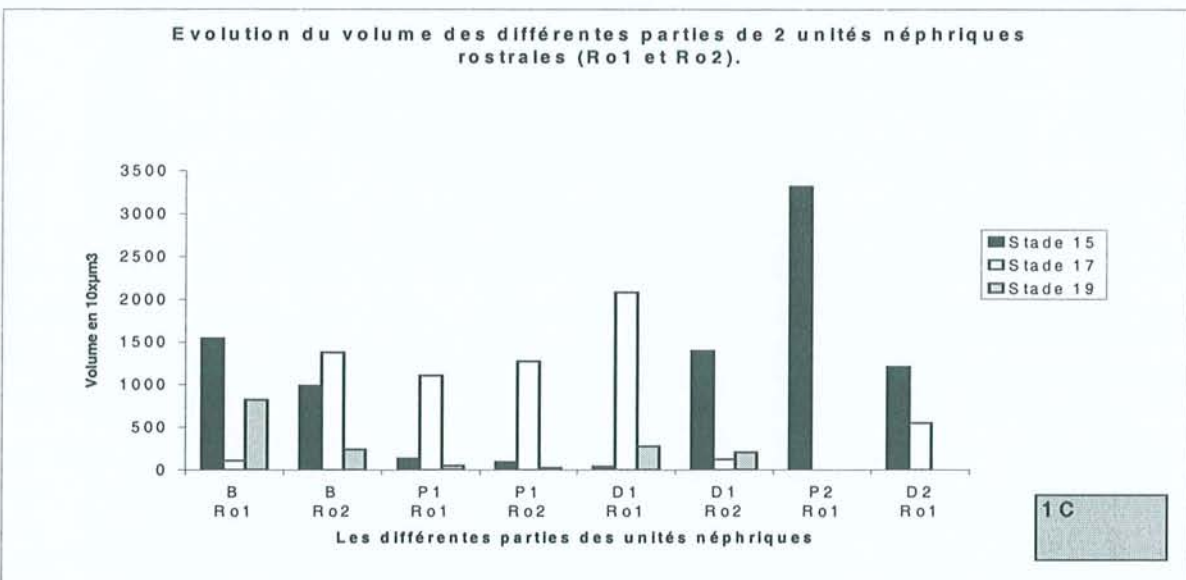
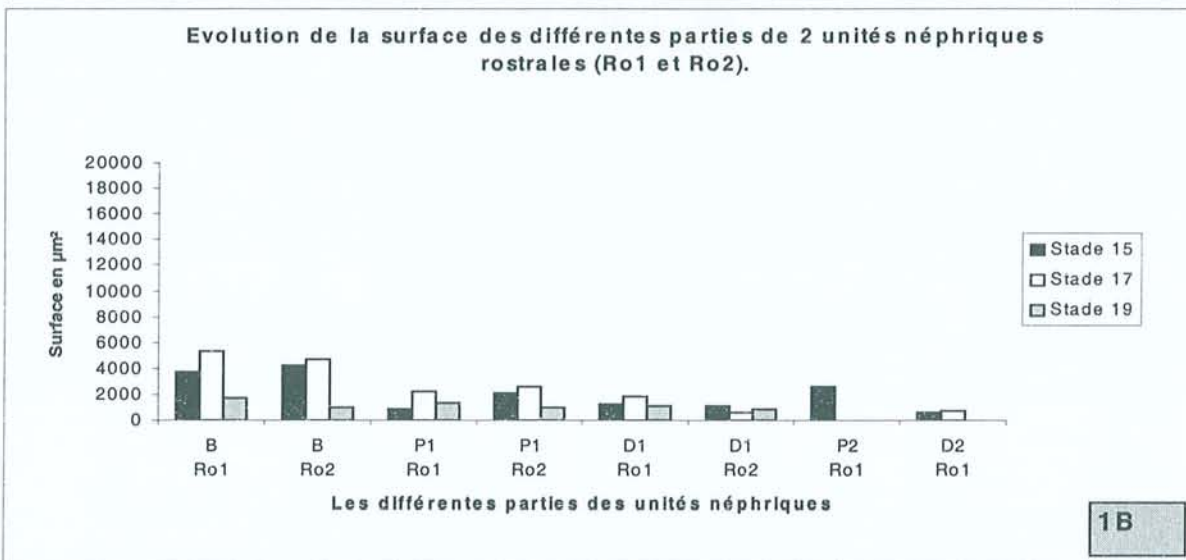
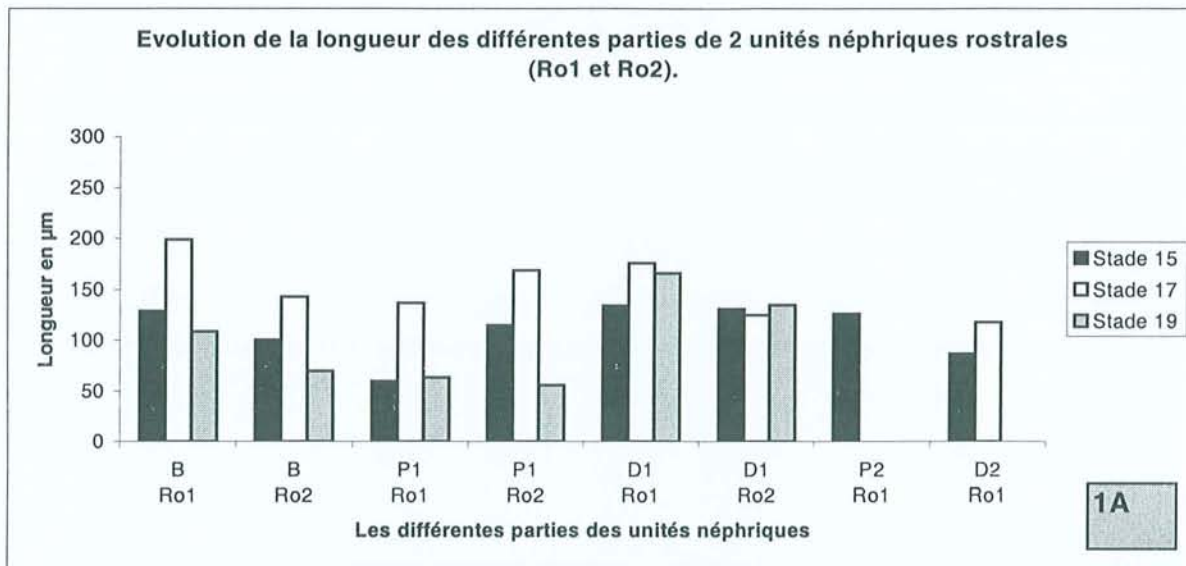
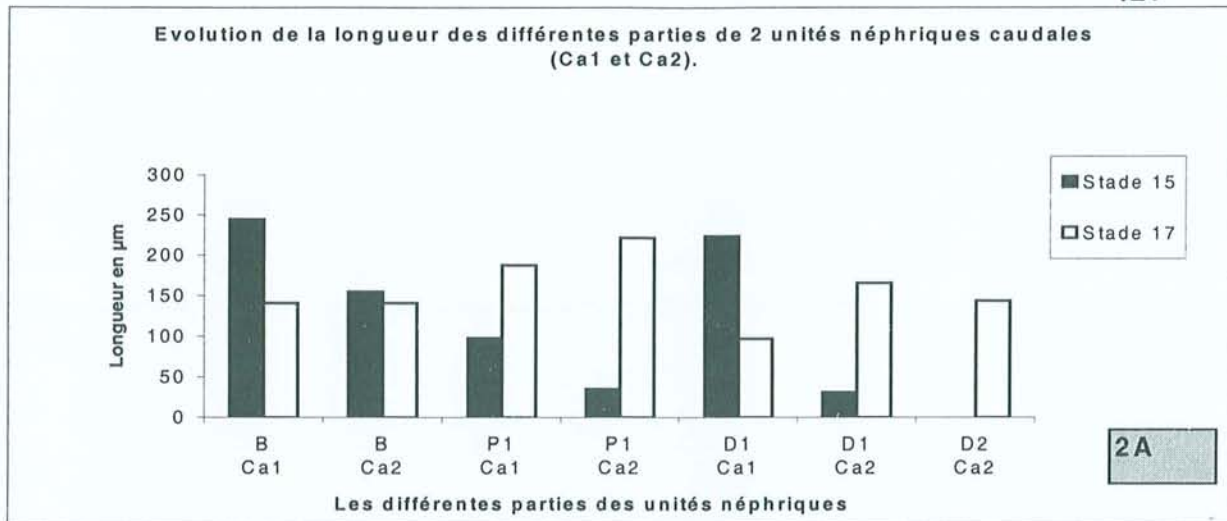
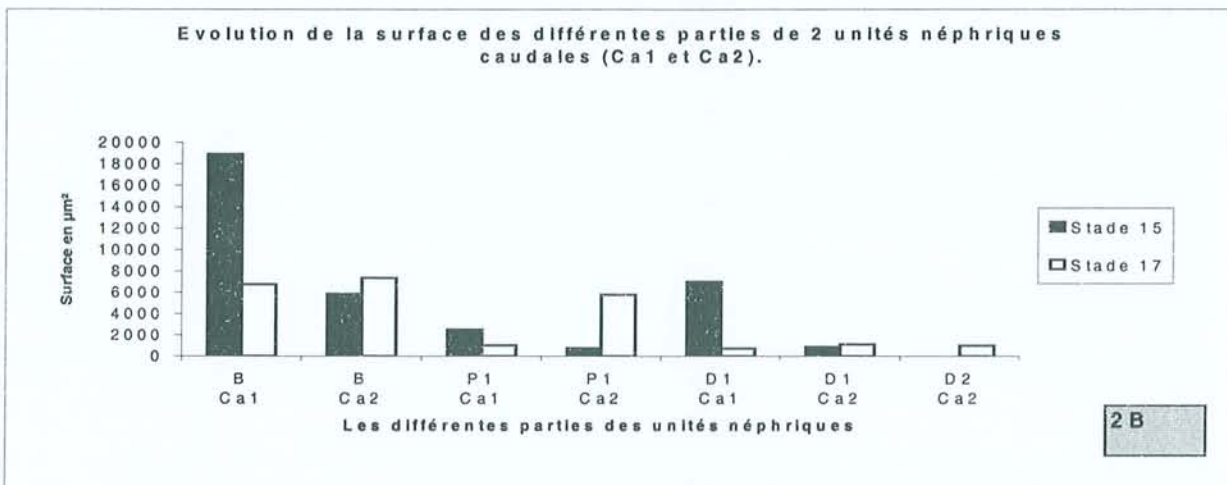


Figure 53 : Evolution des longueurs, surfaces et volumes des différentes parties de 2 unités néphriques rostrales.

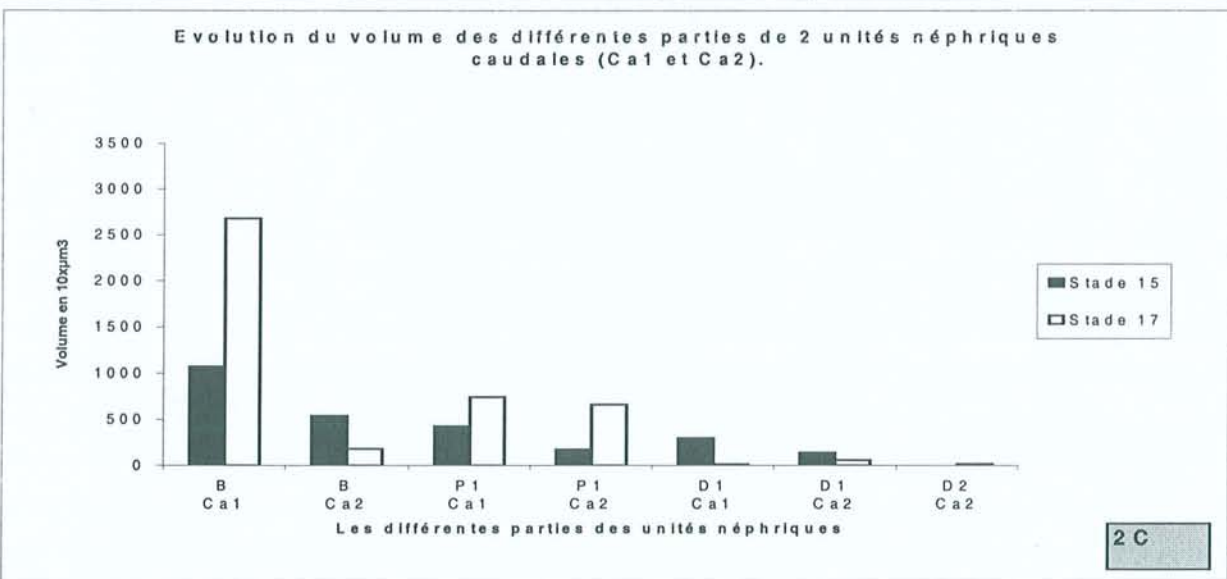
(La capsule de Bowman (B), le 1^{er} ou 2^{ème} tubule proximal (P1 ou P2) et le 1^{er} ou 2^{ème} tubule distal (D1 ou D2)).



2A



2B



2C

Figure 54 : Evolution des longueurs, surfaces et volumes des différentes parties de 2 unités néphriques caudales.

(La capsule de Bowman (B), le 1^{er} ou 2^{ème} tubule proximal (P1 ou P2) et le 1^{er} ou 2^{ème} tubule distal (D1 ou D2)).

3.1.5. Les structures glomérulaires

Les structures glomérulaires ne sont présentes que sur le mésonéphros du stade 19 et s'interconnectent entre elles en donnant la structure multi-vésiculaire présente dans la portion caudale. Pour les 2 stades précédents, il s'agit de tubules qui se terminent par une capsule. La Figure 55 montre une unité néphrique dont la capsule et le tubule sont en phase de croissance.

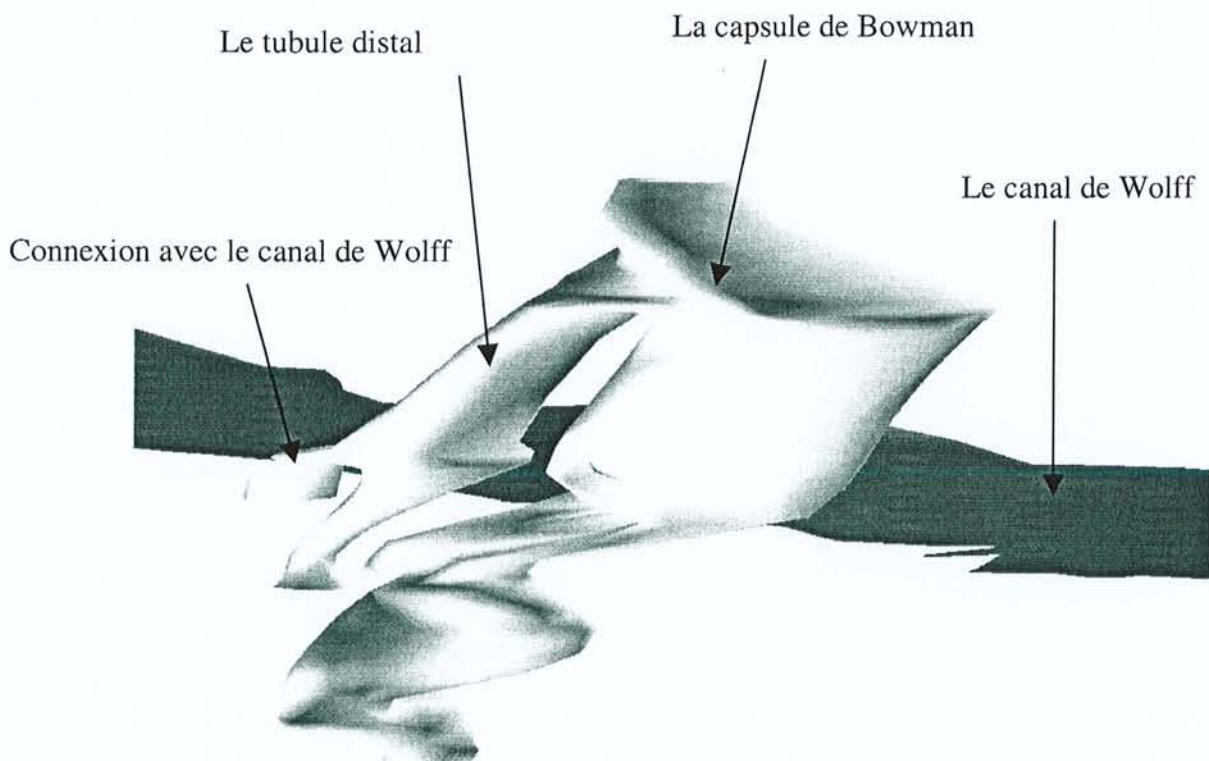


Figure 55: Reconstruction 3D d'une unité néphrique connectée au canal de Wolff d'un mésonéphros humain de stade 17.

3.1.6. Discussion

La reconstruction des mésonéphros humains à 3 stades différents, 15, 17 et 19, permet la visualisation de différents types de tubules et le recueil de données morphométriques.

A ces 3 stades, les tubules liés au canal de Wolff et les tubules isolés apparaissent en nombre quasi équivalent. Au stade 15, 23 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff se répartissent le long du mésonéphros avec 24 autres isolés, pour le stade 17, respectivement 24 et 27, et pour le stade 19, 18 et 18 hormis la structure multi-vésiculaires.

Les 2 premiers mésonéphros reconstruits à 4 et 6 semaines d'âge sont en accord avec les descriptions d'Arey (1965) [2] basées sur les représentations de Shikunami (1926) [113] et de Larsen (1993) [58], lesquelles rapportent la présence d'environ 30 tubules dans chaque mésonéphros d'embryons de 4 à 9 semaines d'âge.

Grâce à gOcad, les dimensions des différentes parties des néphrons sélectionnés ont pu être déterminées. En effet, la longueur des capsules de Bowman varie entre 101 et 245 μm au stade 15, 141 et 199 μm au stade 17 (Tableau 12), en accord avec la taille de l'unité néphrique de 5 semaines d'âge de la Figure 25 proche de 180 μm (Dingemans and Lamers, 1994 [17]). L'analyse de cette même Figure permet de constater que le tubule proximal et le tubule distal dessinés ont une longueur respective de 140 μm et de 130 μm . Ces dimensions ne s'appliquent pas à toutes les unités néphriques suivies. Seules les 2 unités néphriques rostrales s'en rapprochent : les valeurs des tubules proximaux et distaux sont respectivement de 115 et 131 μm au stade 15, et de 169 et 125 μm au stade 17.

Quatre reconstructions d'embryons humains des stades 11 à 23 illustrant les rapports des organes entre eux ont été effectuées. Notamment, un mésonéphros de 5 semaines d'âge a été reconstruit et placé dans son contexte (Figure 5, Machin *et al*, 1996 [65]). La reconstruction effectuée par AUTOCAD n'est pas aussi détaillée que celle réalisée par gOcad, bien qu'elle présente l'avantage de situer le mésonéphros au sein de l'appareil urinaire, au côté de l'appareil digestif.

3.1.7. Conclusion : Réflexions sur le développement du mésonéphros humain

L'analyse des mésonéphros à 3 stades différents montre un nombre fixe de tubules liés au canal de Wolff entre 4 et 6 semaines : 23 et 24. A la 7^{ème} semaine, leur nombre chute à 18, excepté la structure multi-vésiculaires (Tableau 11). Ces résultats sont en accord avec les descriptions de Arey (1965) [2] qui, pour des fœtus de 9 semaines, chiffrent le nombre de tubules à 17. Le présent travail montre que les tubules mésonéphritiques, liés au canal de Wolff, apparaissent en début du développement du mésonéphros, puis se maintiennent en nombre, et se différencient. Le processus ultérieur de régression est marqué par une diminution du nombre de tubules liés de 24 à 18. A la 7^{ème} semaine, ces tubules achèvent leur développement, ils se concentrent rostralement, deviennent courts, fins et perdent leur aspect d'unité néphrique complète.

Des tubules isolés, non liés au canal de Wolff, sont présents aux 3 stades en prenant 3 aspects différents :

- le simple tubule (ST),
- un tubule dont l'extrémité distale se termine par une capsule (TC),
- une unité néphrique avec un tubule proximal, distal et une capsule de Bowman (TN, Tableau 11).

A 4 et 6 semaines d'âge, 24 et 27 tubules isolés apparaissent tout le long du mésonéphros. A 7 semaines d'âge, 18 tubules non liés se localisent uniquement rostralement. Un si grand nombre de tubules isolés de formes distinctes peut s'expliquer par 2 modes de formation :

- certains tubules se développent isolément,
- d'autres apparaissent à la suite d'un processus de régression sur des tubules liés au canal de Wolff.

Même si le nombre des tubules liés au canal de Wolff augmente caudalement entre la 4^{ème} et la 7^{ème} semaine d'âge, rien ne permet d'affirmer qu'il s'agisse bien d'une prolifération rostro-caudale.

Le mode de formation des tubules restent à préciser. D'un point de vue théorique le mode de formation par fusion des tubules isolés avec le canal de Wolff paraît peu probable pour 2 raisons :

- si on suppose qu'un simple tubule fusionne avec le canal de Wolff, croit et se différencie ensuite en une unité néphrique, alors la présence de 7 tubules isolés, non liés, ayant l'aspect d'unité néphrique (TN) dans la portion caudale du mésonéphros de 4 semaines d'âge s'oppose à ce mode de formation.
- si on suppose que le tubule fusionne avec le canal de Wolff, une fois qu'il est complètement différencié en unité néphrique, alors la présence de 12 simples tubules (ST) liés au canal de Wolff, le long du mésonéphros de 4 semaines d'âge, s'oppose aussi à ce mode de formation.

Ces 2 observations sont aussi valables pour la 6^{ème} semaine de développement.

De plus, le nombre de tubules liés est identique pour la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine d'âge. Cette observation suggère un mode de formation par émergence de tubules du canal de Wolff.

Dès la 10^{ème} semaine de développement, le développement maximal du mésonéphros humain est atteint et intervient dans l'élimination de l'urine fœtale (Larsen, 1993 [58]). La structure multi-vésiculaires apparaît à la 7^{ème} semaine. Il serait intéressant d'envisager la reconstruction du mésonéphros, femelle, gauche de 7 semaines d'âge et celui d'un stade ultérieur. Ces modèles fourniraient des informations sur le mode d'apparition des unités néphriques.

3.2. La reconstruction 3D des mésonéphros murins

Le mésonéphros a été étudié au cours de son organogenèse sur 6 stades qui correspondent à 10,5 – 11,5 – 12,5 – 13,5 – 14,5 et 15,5 jours de développement de l'embryon. L'étude des caractéristiques morphologiques de la partie rostrale du mésonéphros, a été suivie. Des prises de mesures ont été réalisées sur :

- les tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff,
- les tubules non liés,
- le canal de Wolff,
- et le canal de Müller.

La surface et le volume de chacun des tubules identifiés, comme définis dans le paragraphe 3.1.4.1., sont mesurés par gOcad. Surface et volume fournissent des informations morphométriques des tubules.

La longueur L d'un tubule est obtenue par application de la formule suivante :

$L = S^2 / (4 \pi V)$ avec S la surface relevée et V le volume correspondant au tubule.

La mesure de l'angle s'effectue de la manière suivante :

On désigne 2 points qui définissent un axe et un vecteur.

On désigne 2 autres points qui définissent un autre axe et un autre vecteur.

Ensuite, on fait le produit scalaire de ces 2 vecteurs, ce qui donne le sinus de l'angle formé par ces deux vecteurs.

Lorsque le tubule est connecté au canal de Wolff, on mesure l'angle présent entre le grand axe du canal de Wolff et l'axe de l'émergence du tubule connecté.

Lorsque le tubule est isolé, on mesure l'angle présent entre le grand axe du canal de Wolff et celui du tubule isolé.

Le calcul de l'orientation des tubules dépend de l'axe de référence qui est défini comme étant le grand axe de la portion la plus rostrale du canal de Wolff.

3.2.1. Résumé des observations des reconstructions 3D de mésonéphros d'embryons murins

Du corps de Wolff se dégage d'abord un canal mésonéphritique sur son bord latéral et sur son bord médian se diverticulisent de petits tubes droits. Ceci est observable sur les mésonéphros mâles 1 à 3 de la Figure 56, mais aussi sur les mésonéphros femelles 10 à 12 de la Figure 58.

Les tubes s'inclinent et croissent latéralement, puis descendent en spirale sous forme d'un J puis d'un S dès 10,5 jours (Figure 57).

A 11,5 jours, les tubules mésonéphritiques rostraux des mésonéphros mâles sont contournés et se courbent sous forme de boucle (Figs. 60 et 61) alors que les mésonéphros femelles ont comme particularité de présenter un tubule très convoluté. A partir du canal de Wolff, 5 bifurcations donnent des tubules dont les extrémités médiales s'interconnectent et forment une structure réticulée rostrale (Figure 62). Cette particularité persiste jusqu'à 13,5 jours, mais le nombre de points de jonction chute à 2 (Figs. 65 et 68). Cette organisation réticulée du tubule le plus rostral des mésonéphros femelles, jusqu'à 13,5 jours, permet de les distinguer des mésonéphros mâles et confère aux tubules une orientation distincte.

A partir de 12,5 jours jusqu'à 15,5 jours, les tubules rostraux vont ensuite se linéariser (Figs. 63 à 74).

A 15,5 jours, les tubules mésonéphritiques mâles s'anastomosent à leur extrémité latérale et se linéarisent en perdant leur aspect bouclé à l'extrémité médiale (Figures 72 à 74). Pour les mésonéphros femelles, la régression des tubules liés au canal de Wolff démarre dès 14,5 jours (Figure 71) et mène les tubules à se linéariser à 15,5 jours (Figure 74).

Les tubules isolés caudaux apparaissent dès 10,5 jours (Figs. 56 à 58), puis prennent, eux aussi, la forme d'un J puis d'un S (Figs. 60 à 62). A 12,5 jours, leur nombre augmente considérablement jusqu'à 24 tubules isolés (Figure 64). Leur augmentation pose le problème de leur origine. L'observation de 2 mésonéphros mâles 7 et 9 de la même portée, apporte une réponse. Le mésonéphros 7 présente surtout des tubules isolés caudaux avec des tubules liés rostraux contournés, alors que le mésonéphros 9, qui présente des tubules isolés caudaux et rostraux, est alors constitué de tubules mésonéphritiques liés, rostraux, linéaires. Ces tubules liés sont plus droits et

plus courts que dans le mésonéphros 7. Cette observation laisse supposer que les tubules isolés rostraux pourraient avoir une origine wolffienne. La forme des tubules isolés rostraux des mésonéphros d'embryons de 13,5 à 15,5 jours, ressemble à celles des tubules mésonéphritiques voisins, liés au canal de Wolff. A 13,5 jours, les tubules isolés rostraux sont contournés (Figures 67 à 71), alors qu'à 15,5 jours, ils sont droits et courts comme les tubules liés au canal de Wolff (Figures 72 à 74).

3.2.2. Les mésonéphros reconstruits

Pour chaque stade étudié, 9 mésonéphros d'embryons mâles et 3 mésonéphros d'embryons femelles ont été reconstruits et répertoriés comme présentés dans les tableaux 4 à 9 du paragraphe 2.1.2.6. Chaque mésonéphros est présenté avec la même orientation. Les tubules mésonéphritiques se dirigent vers la portion rostrale de la gonade droite. Le canal de Wolff est en bleu, le canal de Müller est en vert, les tubules liés au canal de Wolff sont en rouge et les tubules isolés sont en jaune (Figures 56 à 74).

Les caractéristiques morphométriques (volume, surface, longueur et angle formé) associés à ces mésonéphros sont présentées dans les Tableaux 15 à 32. Chaque stade fait l'objet d'une description.

Abréviations :

- 10j1p : mésonéphros d'un embryon de 10,5 jours embryonnaires, n°1 de la portée,
- l (a...z) : élément tubulaire mésonéphrotique lié au canal de Wolff (par exemple (lb) est le tubule b lié au canal de Wolff),
- i (a...z) : élément isolé, non lié au canal de Wolff (par exemple (ie) est le tubule e isolé, non lié au canal de Wolff),
- b : bifurcation,
- r : réticulé,
- pr : pseudoréticulé,
- w : canal de Wolff,
- m : canal de Müller.

3.2.2.1. Descriptions des mésonéphros d'embryons murins de 10,5 jours

3.2.2.1.1. Les mésonéphros de 9 embryons mâles

Dans chacune des portées, les 3 mésonéphros présentent chacun un degré de développement différent (Figures 56 à 58).

- **Les mésonéphros 1, 2 et 3 (1ère portée ; Figure 56, Tableau 15)**

Le mésonéphros 1 est composé d'un corps de Wolff très développé de $1484 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ de surface et constitué de 2 tubules isolés.

Le mésonéphros 2 est formé d'un petit corps de Wolff de $183 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ de surface, d'où se dégage latéralement un canal de Wolff. Sur le bord du corps de Wolff, 3 groupes de tubules *la*, *lb* et *lc* se forment. Leur longueur varie de 48 à 120 μm et leur orientation de 29° à 112° . De ces 3 groupes se dégageront 6 tubules.

Dans le mésonéphros 3, le corps de Wolff est encore visible et le canal de Wolff se dégage latéralement. L'ensemble constitue une surface de $860 \times 10^2 \mu\text{m}^2$. Caudalement, les tubules isolés se sont formés le long du canal de Wolff et dans la portion rostrale du mésonéphros, de courts tubules mésonéphritiques émergent du corps de Wolff. La longueur des tubules s'échelonne de 6 à 110 μm et leur orientation évolue de 111° à 162° .

Les embryons de cette même portée n'ont probablement pas le même âge, ce qui expliquerait les différences entre ces 3 mésonéphros. L'observation de ces 3 mésonéphros montre que du corps de Wolff se dégage le canal de Wolff sous forme d'un tube droit et des tubules mésonéphritiques.

- **Les mésonéphros 4, 5 et 6 (2^{ème} portée ; Figures 56 et 57, Tableaux 15 et 16)**

Tandis que le canal de Wolff se développe, et que le corps de Wolff disparaît, des tubules croissent latéralement (mésonéphros 4 ; Figure 56) et peuvent atteindre 500 à 600 μm (*lb* et *lc* du mésonéphros 5). Chaque tubule connecté prend la forme d'un J, puis d'un S et s'enroule, de sorte que la petite courbure regarde le côté latéral vers le canal de Wolff et que la grande courbure regarde la ligne médiane vers la gonade indifférenciée. Dans le mésonéphros 6, les tubules mésonéphritiques caudaux *lf*, *le* et *ld* ont une forme en J et les tubules rostraux *lc*, *lb*, *la* ont déjà pris la forme d'un S. La

rotation des tubules mésonéphritiques liés qui ont pris la forme d'un J puis d'un S a poussé l'orientation de leur jonction avec le canal mésonéphritique vers l'extrémité caudale, avec une inclinaison de 90 à 116° pour *ld*, *le*, *lf* et ensuite de 82° à 88° pour *la*, *lb*, *lc*.

Les mésonéphros 4 et 5 présentent respectivement 7 et 6 tubules isolés et 4 tubules liés au canal de Wolff ; or le mésonéphros 6 est formé d'un seul tubule isolé, droit et court et de 6 tubules liés en forme de J ou de S (Figures 56 et 57). L'observation des mésonéphros 4 et 5 permet de comprendre le développement des tubules mésonéphritiques, isolés, caudaux. Les tubules isolés sont droits puis se courbent au fur et à mesure que les tubules se rapprochent des tubules rostraux liés au canal de Wolff.

Dans le mésonéphros 5, parmi les 4 tubules liés, *lb* de $675 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ est relié 3 fois au canal de Wolff ; il présente 3 jonctions avec le canal de Wolff, mais il forme 2 amas cellulaires interconnectés. Ce mésonéphros 5 permet de comprendre le passage de 4 tubules liés à 6 ou 7 tubules (Figure 57).

Ces 3 mésonéphros regroupent les 3 étapes de développement des tubules :

- mésonéphros 4 : mode d'apparition de tubules avec des pelotons,
- mésonéphros 5 : mode de formation d'autres tubules, apparition d'amas cellulaires interconnectés,
- mésonéphros 6 : mode de développement des tubules en J puis en S.

• **Les mésonéphros 7, 8 et 9 (3^{ème} portée ; Figures 57 et 58, Tableaux 16 et 17)**

Le mésonéphros 7 est formé d'un corps de Wolff avec 6 tubules mésonéphritiques qui se développent. Les 3 plus rostraux prennent la forme d'un S, alors que les 3 sous-jacents ont une forme de J. Parmi les tubules isolés, le plus rostral est le plus contourné.

Dans le mésonéphros 8, parmi les 4 tubules liés, *le* présente une bifurcation qui sera à l'origine de 2 ou 3 tubules.

Les mésonéphros 7 et 8 ont comme particularité de présenter des tubules isolés rostraux *ib* pour le modèle 7, *ia* et *id* pour le modèle 8.

Dans le mésonéphros 9, les tubules caudaux *li*, *lf*, *le* ont une forme de J avec une inclinaison de 97° à 119° et les tubules rostraux prennent la forme de S : *lc*, *lb*, *la* avec une orientation de 65° à 88° (Tableau 17). Il possède 7 tubules liés et 2 isolés.

Les mésonéphros 7, 8 et 9 confirment les observations de la portée précédente :

- mésonéphros 7 : mode d'apparition des tubules,
- mésonéphros 8 : mode de formation d'autres tubules, apparition de bifurcations,
- mésonéphros 9 : mode de développement des tubules en J puis en S.

3.2.2.1.2. Les mésonéphros de 3 embryons femelles

- **Les mésonéphros 10, 11 et 12 (4^{ème} portée ; Figure 58, Tableau 17)**

Du corps de Wolff des mésonéphros 10 et 11 émergent respectivement 4 et 3 tubules droits et apparaissent caudalement 5 et 7 tubules droits isolés et courts. Dix tubules isolés sur 12 mesurent entre 20 et 80 μm (Tableau 17).

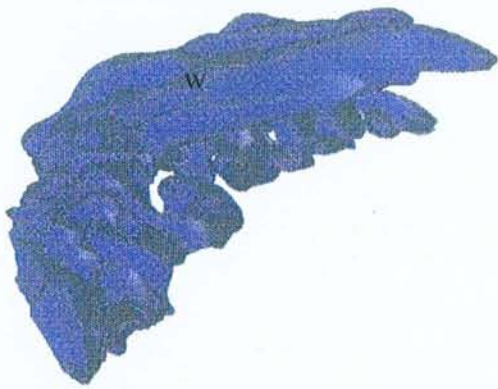
Dans le mésonéphros 12, les tubules *la*, *lb*, *lc*, et *ld* se dégagent du corps de Wolff, qui participeront à la formation de 8 futurs tubules mésonéphritiques. Ce mésonéphros 12 permet de comprendre le passage de 3 à 8 tubules mésonéphritiques liés.

3.2.2.1.3. Conclusion

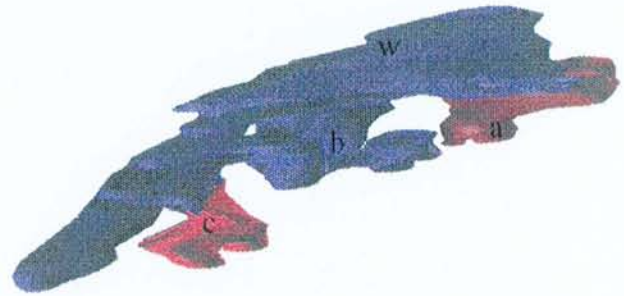
L'observation des mésonéphros mâles et femelles permettent de comprendre :

- **le mode d'apparition des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff :**
 - émergence d'un petit nombre de tubules à partir de la portion rostrale du corps de Wolff,
 - subdivision de ceux-ci,
 - croissance latérale des tubules sous forme de J puis de S.
- **le mode de développement des tubules isolés :**
 - apparition caudale de tubules droits et courts,
 - croissance sous forme de J puis de S.

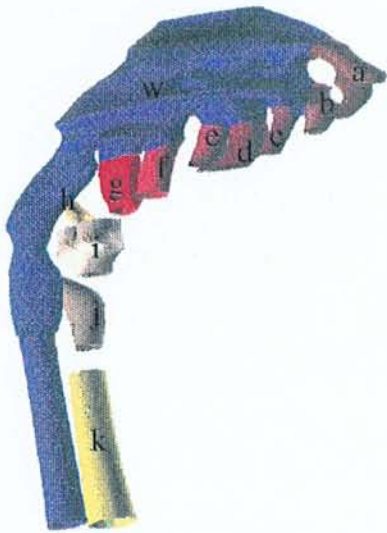
Si ces modèles apportent des informations sur le développement des tubules, ils ne permettent pas de déceler un aspect différencié mâle-femelle.



1



2



3



4

Figure 56 : Mésonéphros 1 à 4 d'embryons mâles de 10,5 jours (échelle : 30 μm).

Tableau 15 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 4 d'embryons mâles de 10,5 jours.

10j 1p	v	s	d	a
i a	20,5	79,6	246,4	81
i b	8,9	39,4	138,9	64
w	1325,4	1483,8	1322,7	
10j 2p	v	s	d	a
l a	240,6	121,0	48,4	112
l b	63,3	77,5	75,5	68
l c	38,8	76,6	120,4	29
w	158,2	183,2	183,4	
10j 3p	v	s	d	a
l a	399,7	53,7	5,7	111
l b	21,9	38,0	52,6	113
l c	17,8	30,4	41,3	147
l d	26,5	41,0	50,5	162
l e	40,8	49,2	47,2	162
l f	10,4	33,4	85,5	149
l g	39,3	73,7	110,0	142
i h	96,8	124,4	127,2	128
i i	30,2	52,7	73,3	120
i j	60,8	67,7	60,1	113
i k	76,6	13,7	1,9	80
w	553,7	859,7	1062,8	
10j 4p	v	s	d	a
l a	161,2	236,5	276,3	121
l b	252,4	309,7	302,6	87
i c	8,2	15,3	22,7	
i d	11,6	19,6	26,2	
l e	100,7	171,5	232,5	46
l f	166,8	252,9	305,2	54
l g	293,8	376,5	384,1	85
l h	753,7	272,9	78,7	100
i i	116,9	154,7	162,9	111
i j	75,8	109,6	126,1	100
w	543,7	1459,7	312,0	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

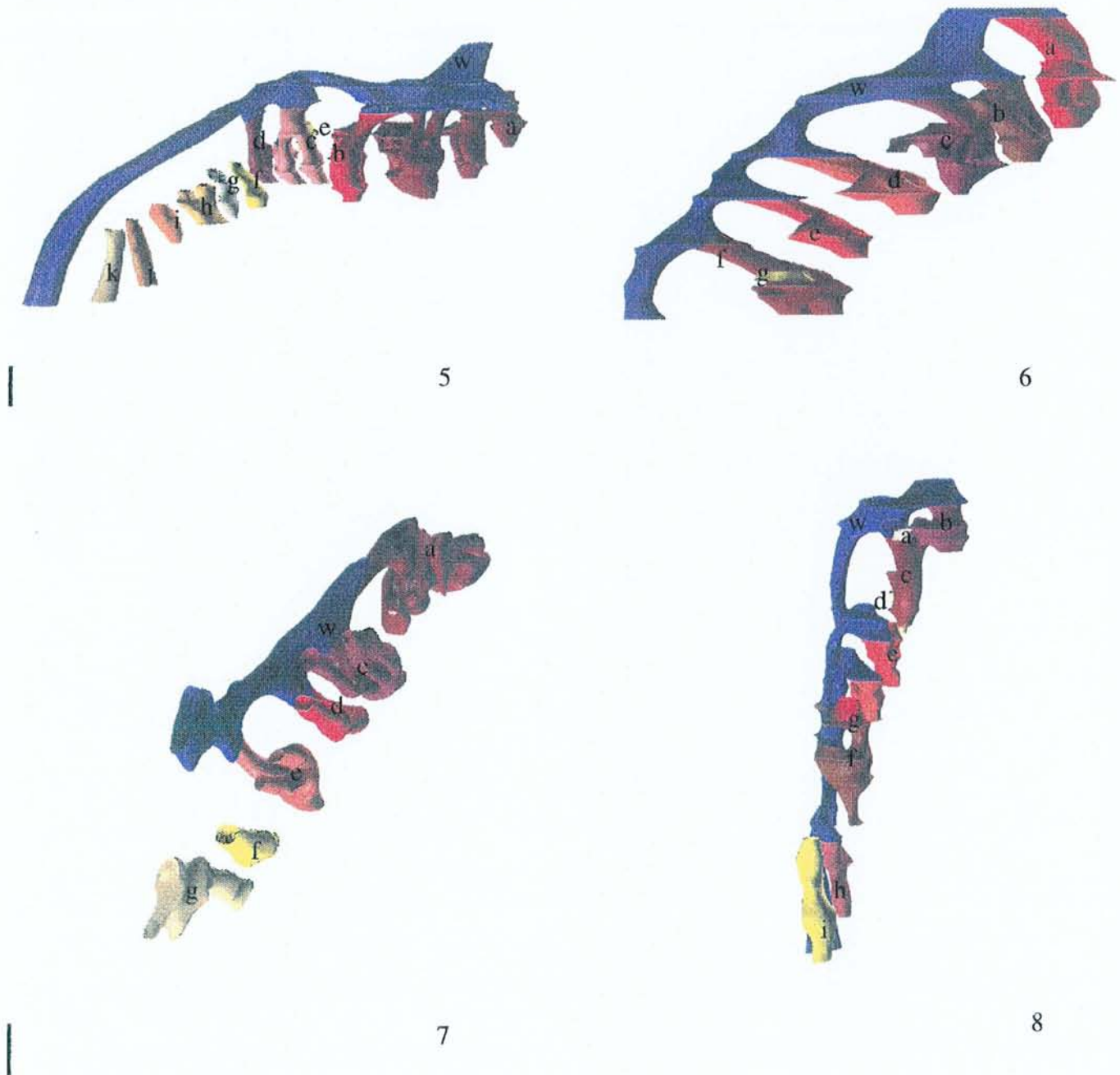


Figure 57 : Mésonéphros 5 à 8 d'embryons mâles de 10,5 jours (échelle : 30 μ m pour les modèles 5 à 6 et 45 μ m pour les modèles 7 et 8).

Tableau 16 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 5 à 8 d'embryons mâles de 10,5 jours.

10j 5p	v	s	d	a
l a	3,6	9,8	21,6	64
l b	675,3	738,8	643,5	102
l c	157,8	328,8	545,4	75
l d	411,7	468,1	423,8	107
i e	0,8	9,2	89,3	99
i f	8,2	80,6	631,4	123
i g	93,2	79,6	54,2	98
i h	10,3	100,6	781,7	95
i i	62,4	72,3	66,7	102
i j	42,8	75,8	106,9	123
i k	212,5	89,6	30,1	108
w	1108,8	1056,9	802,1	

10j 6p	v	s	d	a
l a	197,8	244,7	241,0	82
l b	99,5	179,9	258,8	88
l c	148,6	225,1	271,5	98
l d	128,7	199,6	246,5	116
l e	91,7	144,8	182,2	90
l f	130,1	184,3	207,7	114
i g	13,4	18,5	20,3	76
w	373,2	558,1	664,5	

10j 7p	v	s	d	a
l a	455,1	485,2	411,9	74
i b	12,5	28,5	51,6	65
l c	141	224,2	283,8	90
l d	115,2	150,7	157,0	67
l e	165,2	222,8	239,2	96
i f	120,5	100,3	66,5	71
i g	122,3	171,4	191,2	77
w	412,1	443,0	379,2	

10j 8p	v	s	d	a
i a	155,9	197,5	199,2	20
l b	271,5	322,4	304,8	59
l c	146,8	244,6	324,4	107
i d	24,9	41,5	55,3	22
l (b) e	327,1	683,5	1137,3	52
l f	58,3	205,7	578,3	80
l g	7,9	23,1	54,0	34
l h	87,8	133,6	161,8	
i i	6,2	8,7	9,6	
w	295,2	465,2	583,8	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,
d : sa distance en μm ,
a : l'angle formé en degré.



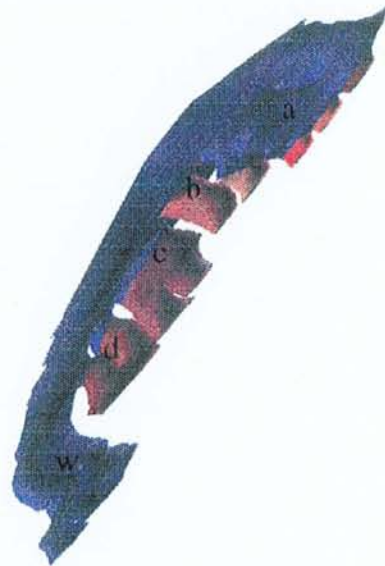
9



10



11



12

Figure 58 : Mésonéphros 9 d'un embryon mâle et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 10,5 jours (échelle : 45 μm pour le modèle 9 et 15 μm pour les modèles 10 à 12).

Tableau 17 : Caractéristiques morphométriques du mésonéphros 9 mâle et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 10,5 jours.

10j 9p	v	s	d	a
i a	155,9	197,5	199,2	20
l b	271,5	322,4	304,8	59
l c	146,8	244,6	324,4	107
i d	24,9	41,5	55,3	22
l (b) e	327,1	683,5	1137,3	52
l f	58,3	205,7	578,3	80
i g	7,9	23,1	54,0	34
i h	87,8	133,6	161,8	
i i	6,2	8,7	9,6	
w	295,2	465,2	583,8	

10j 10p	v	s	d	a
l a	26,0	32,1	31,5	128
l b	32,9	30,4	22,3	112
l c	9,0	16,3	23,8	78
l d	135,2	166,4	162,9	71
i e	36,7	52,5	59,6	76
i f	63,4	70,1	61,7	108
i g	82,0	68,9	46,1	89
i h	34,6	52,8	64,3	145
i i	22,8	45,8	73,4	94
w	1187,2	1084,3	788,4	

10j 11p	v	s	d	a
l a	12,4	23,3	34,9	37
l b	12,6	22,2	31,2	118
l c	39,7	61,6	76,1	109
i d	41,4	55,7	59,8	110
i e	43,8	56,2	57,4	77
i f	27,4	40,0	46,5	63
i g	36,5	48,7	51,8	110
i h	75,4	13,1	1,8	77
i i	90,1	72,2	46,1	17
i j	4,4	8,8	13,9	
w	1265,7	1205,6	914,3	

10j 12p	v	s	d	a
l a	137,3	147,9	126,8	69
l b	569,0	433,7	263,2	110
l c	133,6	79,1	37,3	83
l d	95,0	108,0	97,7	74
w	1604,7	1108,1	616,7	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,
d : sa distance en μm ,
a : l'angle formé en degré.

3.2.2.2. Descriptions des mésonéphros d'embryons murins de 11,5 jours

3.2.2.2.1. Les mésonéphros de 9 embryons mâles

- **Les mésonéphros 1, 2 et 3 (1ère portée ; Figure 60, Tableau 18)**

Dans le mésonéphros 1, les 5 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff ont une orientation caudogyre (Figure 59). Les tubules isolés sont courts et droits : *ik* et *ij*, caudalement, puis prennent une forme curvilinéaire lorsqu'ils se rapprochent des tubules liés : *if* et *ig*. Le volume des tubules isolés augmentent de $17.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ à $87.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, leur surface de $30.5 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ à $134.3 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ et leur longueur de $43.0 \mu\text{m}$ à $164.9 \mu\text{m}$ aussi. L'observation des caractéristiques morphologiques des tubules isolés montre que les premiers à se développer sont probablement les plus rostraux. Le volume des tubules liés varie de $150 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ à $950 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Les tubules liés ont un mode de croissance indépendant de celui des tubules isolés.

Le mésonéphros 2 est constitué de tubules mésonéphritiques et de tubules isolés. A partir du canal de Wolff, 3 bifurcations se produisent :

- la plus rostrale se produit à proximité du canal et donne les tubules *la* et *lc*,
- la seconde, très proche du canal de Wolff, donne les tubules *ld* et *le*,
- la troisième bifurcation est plus éloignée et se distingue dans le tubule *lf*.

Le dernier tubule *lg* ne fait pas l'objet d'une bifurcation. Tous les tubules ont une orientation caudogyre, sauf *lc* qui a une orientation rostroggyre (Figure 59). Parmi les tubules isolés caudaux, certains sont plus développés que d'autres : les tubules *ih*, *ii* et *ij* varient de $193.7 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ à $117.1 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ de surface et de 698 à $105.9 \mu\text{m}$ de longueur. Les tubules isolés les plus proches des derniers tubules liés au canal de Wolff sont les plus développés. Ce mésonéphros a la particularité de présenter, un tubule isolé rostral *ib*, droit et court, de $90 \mu\text{m}$ de longueur. L'origine de ce tubule est probablement une régression de tubules liés, *la* ou *lc*, qui sont les plus proches.

Du mésonéphros 3, seuls 2 tubules isolés sont formés mais 4 bifurcations se produisent :

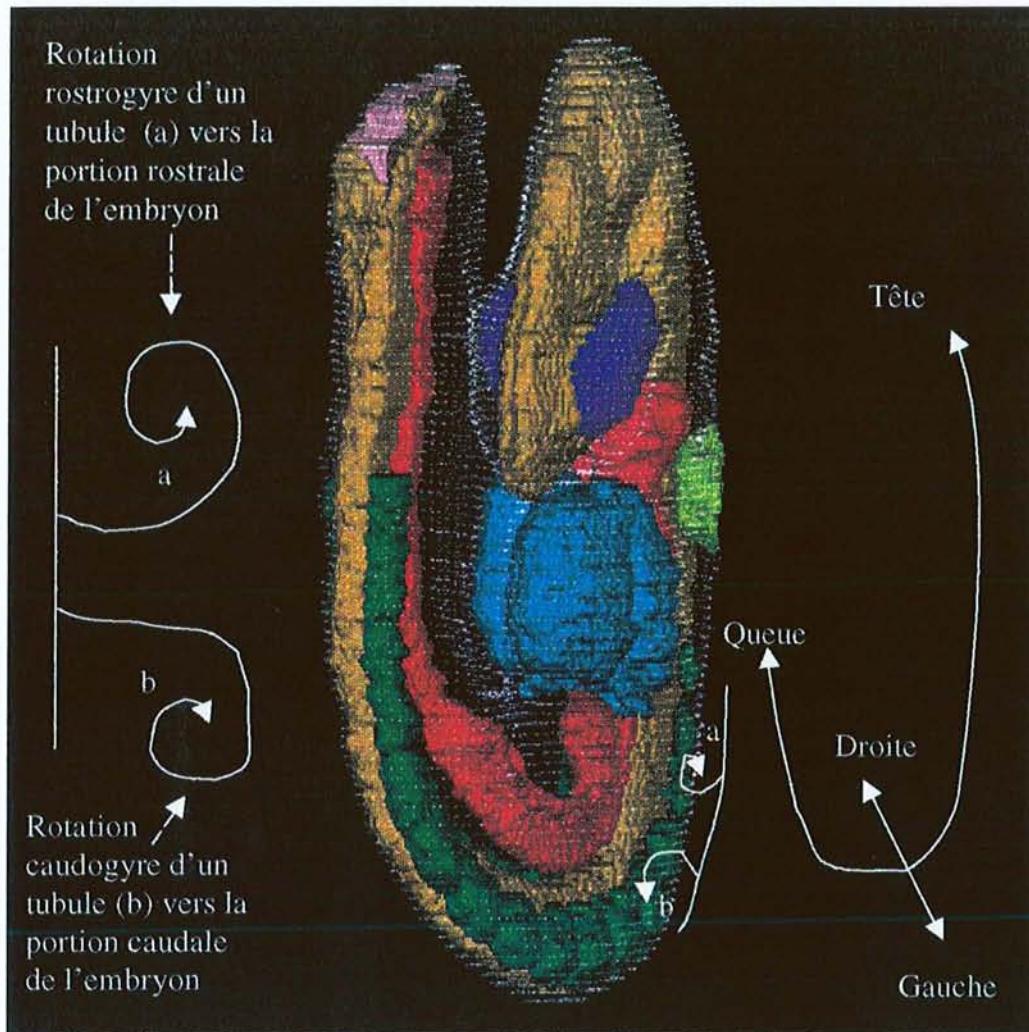


Figure 59 : Notion de rotation rostrogyre et caudogyre des tubules mésonéphritiques par rapport à l'orientation d'un embryon de 9 jours (Davidson *et al*, 1998).

(Une pseudo-3D vue d'un embryon de 9 jours avec le tube nerveux en jaune, l'intestin en rouge, le cœur en bleu clair, les somites en vert, les vésicules optiques en bleu foncé, la ligne primitive en rose.)

- la 1^{ère} bifurcation donne 2 tubules caudogyres *la'* et *la*,
- la 2^{ème} bifurcation donne 2 tubules caudogyres regroupés par *lb*,
- la 3^{ème} bifurcation donne 2 branches *lc* et *ld* caudogyres,
- la 4^{ème} bifurcation donne une branche *le* rostogyre et une branche *lf* caudogyre.

L'observation de ces 3 mésonéphros montre que :

- les tubules mésonéphritiques peuvent subir après leur émergence du canal de Wolff, une bifurcation,
- l'enroulement des tubules mésonéphritiques est principalement caudogyre,
- les tubules isolés sont d'autant plus développés qu'ils se rapprochent des tubules liés,
- un tubule isolé est aussi présent dans la portion la plus rostrale du mésonéphros.

- **Les mésonéphros 4, 5 et 6 (2^{ème} portée ; Figure 61, Tableau 19)**

Le mésonéphros 4 est formé de 4 tubules mésonéphritiques rostraux caudogyres et de 8 tubules isolés caudaux. Parmi les tubules liés, le tubule *lc* présente une bifurcation donnant 2 branches caudogyres. Les mésonéphros 5 et 6 sont constitués de tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff, rostraux et de tubules isolés caudaux, comme le mésonéphros 4, mais il apparaît un tubule isolé rostral *ib* dans le mésonéphros 5 et *ie* dans le mésonéphros 6.

- **Les mésonéphros 7, 8 et 9 (3^{ème} portée ; Figure 62, Tableau 20)**

Ces 3 mésonéphros sont constitués, rostralement, de tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff qui descendent sous forme de spirale rostro ou caudogyre. Caudalement, des tubules isolés sont présents. Ces tubules isolés sont d'autant plus courts et droits qu'ils sont caudaux (*ij* et *ik* dans le mésonéphros 7, *ih* et *if* dans le mésonéphros 8, *ih* dans le mésonéphros 9). Inversement, plus ils se rapprochent des derniers tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff, plus ils prennent une forme spiralée (*ih* dans le mésonéphros 7, *id* dans le mésonéphros 8, *ie* dans le mésonéphros 9).

3.2.2.2.2. Les mésonéphros de 3 embryons femelles

- **Les mésonéphros 10, 11 et 12 (4^{ème} portée ; Figure 62, Tableau 20)**

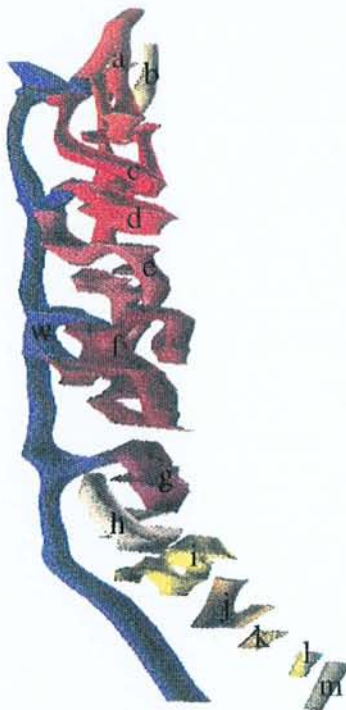
Dans la portion caudale des mésonéphros droits femelles 10, 11 et 12, les tubules isolés prennent une forme de J puis de S, suivant le même processus de formation que dans les mésonéphros mâles 1 à 9. Les tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff présentent uniquement une orientation caudogyre. De plus, dans les deux mésonéphros 10 et 11, les tubules mésonéphritiques s'organisent sous forme d'une structure réticulée à partir du canal de Wolff en 4 points. De ces 4 points d'émergence, des bifurcations vont être à l'origine des tubules spiralés. Cette structure distinguerait les mésonéphros femelles des mésonéphros mâles et expliquerait que le volume de certains tubules liés des mésonéphros femelles soient plus volumineux que ceux des mésonéphros mâles. Le mésonéphros 12 semble être plus tardif du fait de la présence de 6 tubules curvilinéaires liés au canal de Wolff, de la présence d'un seul tubule caudal isolé et de l'apparition du processus de régression comme par exemple le tubule isolé rostralement *ie*.

3.2.2.2.3. Conclusion

Un aspect différencié mâle-femelle est observé par l'apparition de structures réticulées dans les mésonéphros d'embryons femelles absentes dans les mésonéphros des embryons mâles. Une croissance des différents tubules est observable. Les tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff sont plus longs qu'au stade précédent. Ils peuvent atteindre jusqu'à 1048 μm pour *ld* dans le mésonéphros 3 et 1340 μm pour *la* dans le mésonéphros 8. La taille des tubules isolés s'échelonne de 36 à 730 μm dans la 1^{ère} portée, de 2 à 360 μm dans la 2^{ème} portée et de 25 à 670 μm dans la 3^{ème} portée. Des tubules rostraux isolés, dans les mésonéphros d'embryons mâles apparaissent et sont l'objet d'une régression probable des tubules liés rostraux voisins.



1



2



3

Figure 60 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 11,5 jours (échelle : 45 μ m).

Tableau 18 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 11,5 jours.

11j 1p	v	s	d	a
l a	308,7	454,4	532,4	24
l b	147,1	261,1	369,0	58
l c	953,7	407,6	138,7	62
l d	199,3	256,0	261,8	126
l e	163,9	273,0	362,1	118
i f	87,2	134,3	164,9	52
i g	84,7	120,2	135,9	22
i h	60,7	99,1	128,6	28
i i	58,7	87,4	103,6	37
i j	36,9	68,0	99,6	19
i k	17,2	30,5	43,0	33
w	412,5	671,7	870,9	

11j 2p	v	s	d	a
l a	96,8	221,6	403,8	140
i b	26,0	54,0	89,3	34
l c	696,5	242,1	67,0	43
l d	150,0	269,2	384,5	98
l e	500,2	353,6	199,0	48
l f	277,9	450,0	580,1	49
l g	558,8	226,7	73,2	51
i h	42,8	193,7	698,0	126
i i	26,9	157,2	730,7	26
i j	103,0	117,1	105,9	43
i k	10,7	21,2	33,4	44
i l	18,6	29,1	36,3	46
i m	24,8	43,7	61,3	19
w	414,8	796,7	1218,5	

11j 3p	v	s	d	a
l a'	124,2	177,3	201,5	111
l a	134,6	280,8	466,6	58
l b	379,7	475,2	473,4	121
l c	129,7	201,8	249,9	50
l d	132,9	418,4	1048,8	129
l e	488,1	768,6	963,7	73
l f	233,9	333,7	379,0	138
i g	22,9	44,2	67,9	52
i h	5,1	13,1	26,7	27
w	494,6	897,7	1297,2	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.



Figure 61 : Mésonéphros 4 à 6 d'embryons mâles de 11,5 jours (échelle : 45 μ m).

Tableau 19 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 6 d'embryons mâles de 11,5 jours.

11j 4p	v	s	d	a
l a	111,7	156,1	173,6	124
l b	386,3	482,2	479,3	96
l c	150,8	277,8	407,6	106
l d	382,6	647,1	871,3	120
i e	165,1	243,8	286,6	43
i f	9,0	16,5	24,1	50
i g	193,1	295,7	360,4	78
i h	132,2	187,9	212,6	72
i i	110,5	162,8	191,0	64
i j	122,0	168,3	184,9	44
i k	16,6	33,6	54,1	39
i l	18,3	33,1	47,5	138
w	1079,0	1146,4	969,6	

11j 5p	v	s	d	a
l a	163,6	279,5	380,3	50
i b	92,0	161,4	225,5	8
l c	105,0	189,3	271,7	70
l d	181,9	329,8	475,9	56
l e	409,7	445,2	385,2	63
l f	135,6	208,8	256,1	97
i g	83,5	143,6	196,7	56
i h	51,4	10,2	1,6	71
i i	182,1	282,5	348,8	48
i j	160,5	238,4	281,8	46
i k	65,1	128,3	201,1	53
w	1399,8	785,5	351,0	

11j 6p	v	s	d	a
l a	225,6	307,6	333,9	136
l b	191,6	299,2	372,2	116
l c	3,6	10,2	23,2	
l d	427,4	591,3	651,2	86
i e	79,4	136,6	187,0	57
i f	9,1	19,2	32,1	10
i g	99,9	147,9	174,4	132
i h	182,3	231,3	233,6	46
i i	121,5	148,1	143,7	13
i j	40,7	59,4	69,0	14
w	364,4	546,6	652,9	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

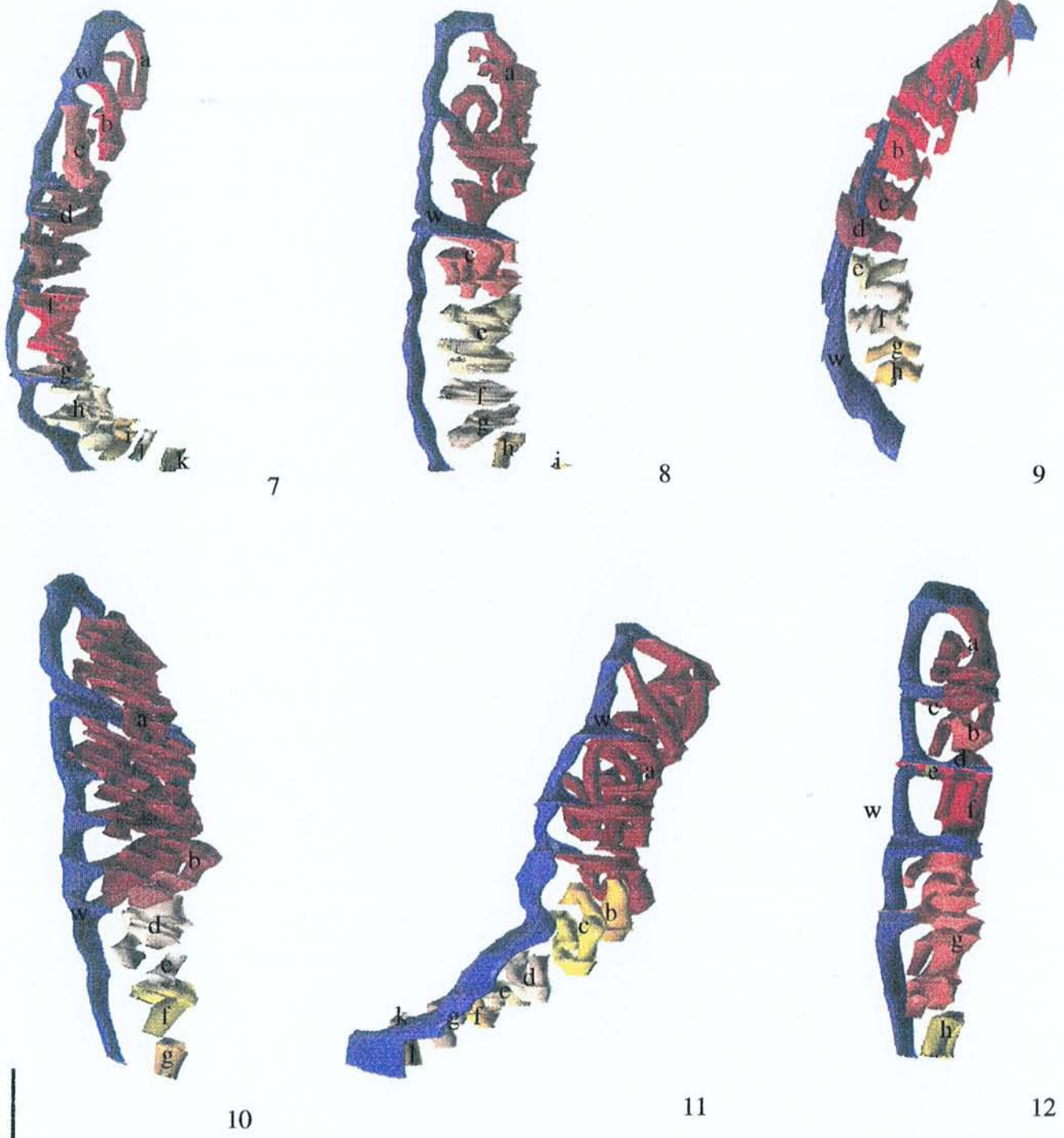


Figure 62 : Mésonéphros 7 à 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 11,5 jours (échelle : 55 μ m pour les modèles 7 à 9, 60 μ m pour le mésonéphros 10 et 40 μ m pour les mésonéphros 11 et 12).

Tableau 20 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 7 à 9 d'embryons mâles et des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 11,5 jours.

11j 7p	v	s	d	a
l a	123,2	198,5	254,5	33
l b	155,0	225,6	261,4	40
l c	217,2	322,0	380,1	34
l d	622,8	744,3	708,2	98
l e	15,0	23,7	30,0	56
l f	380,9	550,7	633,9	81
l g	319,0	189,7	89,9	132
i h	340,8	536,0	671,2	15
i i	83,1	121,8	142,1	36
i j	37,7	62,1	81,4	137
i k	36,5	48,8	52,0	8
w	768,6	1160,5	1395,1	

11j 8p	v	s	d	a
l a	809,1	1167,1	1340,3	40
l b	4,1	9,5	17,4	76
l c	551,8	430,1	267,0	58
i d	7,7	15,8	25,7	51
i e	340,7	528,9	653,7	25
i f	138,7	248,6	354,8	10
i g	176,2	253,6	290,6	10
i h	70,2	99,1	111,3	33
i i	0,3	5,7	90,5	117
w	535,3	846,4	1065,6	

11j 9p	v	s	d	a
l a	202,8	313,9	386,9	66
l b	213,5	301,0	337,8	65
l c	161,5	279,7	385,6	66
l d	193,5	243,5	244,1	65
i e	110,9	132,8	126,7	111
i f	244,9	314,2	321,0	103
i g	58,1	84,7	98,4	133
i h	79,8	109,3	119,3	144
w	723,9	1909,9	401,2	

11j 10p	v	s	d	a
l (r) a	1862,8	1289,7	710,9	40
l b	311,3	427,6	467,6	102
i c	31,7	63,1	100,1	108
i d	309,6	403,4	418,6	122
i e	59,6	78,9	83,1	61
i f	191,8	198,0	162,8	50
i g	94,9	113,2	107,5	89
w	351,7	1311,4	389,3	

11j 11p	v	s	d	a
l a	833,8	966,0	891,1	92
i b	227,7	500,8	877,2	71
i c	168,0	435,1	897,3	37
i d	232,9	217,2	161,3	59
i e	93,5	124,7	132,3	167
i f	161,8	207,8	212,4	34
i g	41,5	68,5	90,0	24
i h	125,2	166,0	175,2	31
i j	38,7	48,6	48,7	107
i k	6,3	10,7	14,3	158
i l	118,8	105,6	74,8	53
w	1326,8	1575,8	1490,2	

11j 12p	v	s	d	a
l a	362,3	423,4	394,1	43
l b	209,1	258,8	255,0	93
l c	5,6	8,9	11,4	77
l d	24,7	34,1	37,5	103
i e	56,5	37,7	20,0	
l f	890,7	337,2	101,6	88
l g	896,3	917,3	747,5	94
i h	127,8	154,3	148,4	21
w	1551,3	1283,8	845,8	

v: volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,
d : sa distance en μm ,
a : l'angle formé en degré.

3.2.2.3. Descriptions des mésonéphros d'embryons murins de 12,5 jours

3.2.2.3.1. Les mésonéphros de 9 embryons mâles

- **les mésonéphros 1, 2 et 3 (1^{ère} portée ; Figure 63, Tableau 21)**

Les mésonéphros 1 et 2 présentent respectivement 3 et 4 tubules liés au canal de Wolff qui forment des spirales caudogyres. Ils se concentrent dans la portion rostrale du mésonéphros et les tubules isolés s'étalent le long du canal de Wolff avec un aspect plus contourné que ceux du stade précédent.

Les tubules mésonéphritiques du mésonéphros 3 descendent en formant de larges boucles.

- **les mésonéphros 4, 5 et 6 (2^{ème} portée ; Figure 64, Tableau 22)**

Les 3 mésonéphros présentent 4 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff et un canal de Müller.

Les mésonéphros 4 et 5 se caractérisent par une bifurcation respectivement en *la* et *lc* et par un grand nombre de tubules isolés caudaux, respectivement 7 et 8. Ces tubules isolés ne sont plus de simples tubes droits et courts.

Parmi les tubules mésonéphritiques du mésonéphros 6, des tubules isolés rostraux apparaissent. Certains tubules mésonéphritiques ont perdu leur extrémité distale spiralée. Exceptés 3 tubules isolés rostraux qui pourraient avoir une origine dans les tubules mésonéphritiques voisins, ce mésonéphros est alors composé de 8 tubules isolés caudaux comme les 2 autres mésonéphros.

- **les mésonéphros 7, 8 et 9 (3^{ème} portée ; Figures 64 et 65, Tableaux 22 et 23)**

Ces 3 mésonéphros présentent chacun un degré différent de développement et le canal de Müller apparaît.

Le mésonéphros 7 est formé de 6 tubules mésonéphritiques qui descendent en spirale caudogyres et de 5 tubules isolés caudaux.

Le mésonéphros 8 présente 6 tubules mésonéphritiques qui ont perdu leur forme spiralée sauf pour *lb* et 9 tubules isolés dont les 7 rostraux ont probablement pour origine les tubules mésonéphritiques voisins.

Le mésonéphros 9 est constitué de 5 tubules mésonéphritiques droits qui n'ont plus la forme de tubule spiralisée, et de 24 tubules isolés. Comme le mésonéphros 8, 6 tubules isolés rostraux se localisent aux extrémités des tubules mésonéphritiques rostraux. D'autre part, l'extrémité rostrale du canal de Müller est fragmenté révélant la mise en place de mécanisme de régression.

3.2.2.3.2. Les mésonéphros de 3 embryons femelles

- *les mésonéphros 10, 11 et 12 (4^{ème} portée ; Figure 65, Tableau 23)*

Ces 3 mésonéphros présentent des tubules qui descendent du canal de Wolff sous forme de spirales avec une orientation caudogyre (Figure 64). Tous 3 présentent des tubules isolés. Les mésonéphros 11 et 12 présentent tous les 2, rostralement un tubule isolé *ia* et *id*, argument en faveur d'un début du processus de régression. Dans le mésonéphros 10, le tubule le plus rostral est connecté 3 fois au canal de Wolff sous forme d'un réseau; alors que le mésonéphros 11 présente rostralement une bifurcation en *lb*, et le mésonéphros 12 en *la* et en *lb*.

3.2.2.3.3. Conclusion

Les mésonéphros d'embryons mâles 1 à 3 correspondent à un stade de maturation plus précoce que les mésonéphros 4 à 9. Ces derniers présentent le canal de Müller et 5 à 24 tubules isolés. Seul le mésonéphros 10 d'un embryon femelle présente une structure réticulée.

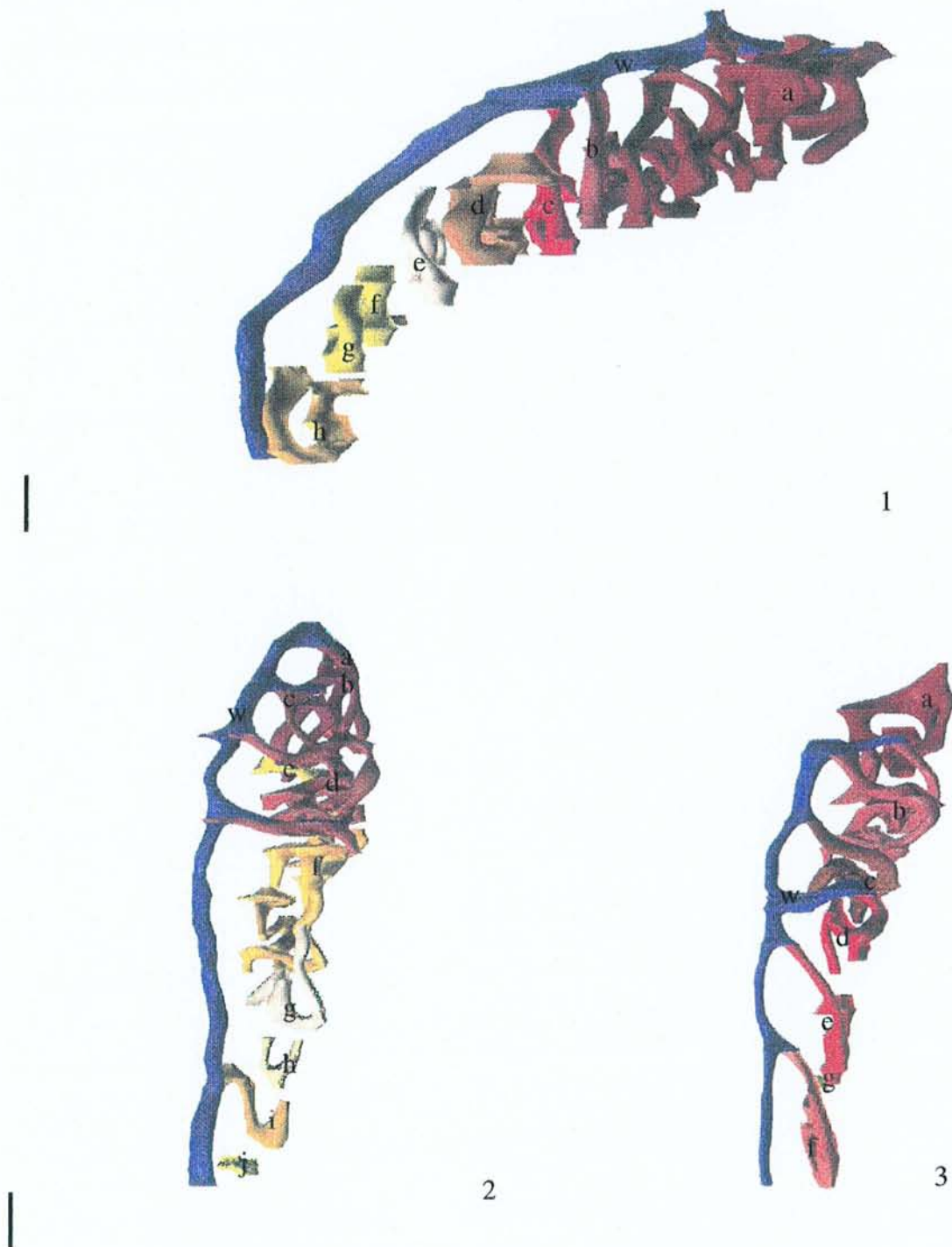


Figure 63 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 12,5 jours (échelle : 30 μm pour le mésonéphros 1 et 40 μm pour les mésonéphros 2 et 3).

Tableau 21 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 12,5 jours.

12j 1p	v	s	d	a
l(b) a	476,5	1412,0	3331,3	75
l b	102,8	226,9	398,7	74
l c	95,6	216,3	389,5	78
i d	151,2	273,0	392,4	80
i e	72,2	152,9	257,8	85
i f	94,7	177,6	265,3	63
i g	4,1	8,5	14,3	90
i h	120,5	217,1	311,5	62
w	330,2	632,8	965,4	

12j 2p	v	s	d	a
l a	94,8	209,4	368,3	76
l b	127,8	281,3	492,8	117
l c	19,4	80,0	263,1	72
l(b) d	118,2	696,9	3271,0	84
i e	64,2	145,8	263,8	97
i f	348,7	795,8	1446,1	
i g	109,0	216,1	340,9	119
i h	31,1	72,5	134,6	136
i i	72,7	143,0	223,9	61
i j	17,9	34,4	52,6	102
w	258,6	708,3	1544,9	

12j 3p	v	s	d	a
l a	186,8	324,7	449,4	124
l(b) b	371,4	715,6	1097,8	117
l c	736,4	409,5	181,3	80
l d	100,1	243,2	470,5	118
l e	122,9	88,5	50,7	62
l f	155,3	316,9	514,6	71
i g	365,3	907,4	1794,6	59
w	268,8	548,6	891,5	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.



Figure 64 : Mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 12,5 jours (échelle : 45 μ m).

Tableau 22 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 12,5 jours.

12j 4p	v	s	d	a
l a	129,2	236,6	345,1	99
l b	181,1	411,9	746,1	84
l c	18,1	49,2	106,8	107
l d	183,2	423,2	778,7	107
i e	107,5	221,7	364,1	107
i f	83,4	205,7	403,9	123
i g	14,1	38,5	83,9	122
i h	78,1	178,7	325,5	119
i i	28,2	48,9	67,5	76
i j	31,3	71,9	131,4	106
i k	16,0	75,0	280,4	113
w	392,8	796,1	1284,7	
m	418,0	820,6	1282,6	

12j 5p	v	s	d	a
l a	83,6	191,1	348,2	89
l b	18,9	45,8	88,3	93
l c	1166,9	1157,8	914,6	104
l d	131,2	298,4	540,2	122
i e	149,3	719,5	2761,2	107
i f	27,8	59,7	102,0	118
i g	140,1	244,5	339,6	132
i h	86,8	190,4	332,6	106
i i	70,2	119,3	161,6	58
i j	7,6	17,8	33,3	65
i k	17,1	40,6	76,9	53
i l	55,0	128,3	238,2	88
w	525,5	896,0	1216,3	
m	600,8	917,0	1114,3	

12j 6p	v	s	d	a
l a	169,5	475,6	1062,5	92
i b	164,7	179,6	155,9	27
i c	61,2	121,8	192,8	27
l d	240,4	48,7	7,8	113
l e	222,8	247,0	217,9	82
l f	93,2	234,0	467,8	117
i g	854,3	203,6	38,6	39
i h	659,6	203,8	50,2	85
i i	78,4	174,0	307,4	32
i j	327,3	282,4	194,0	32
i k	43,0	127,5	301,1	28
i l	209,7	200,9	153,2	45
i m	40,5	75,0	110,5	119
i n	88,0	157,1	223,3	98
i o	6,7	14,6	25,4	115
w	805,4	759,3	569,9	
m	392,9	693,9	975,6	

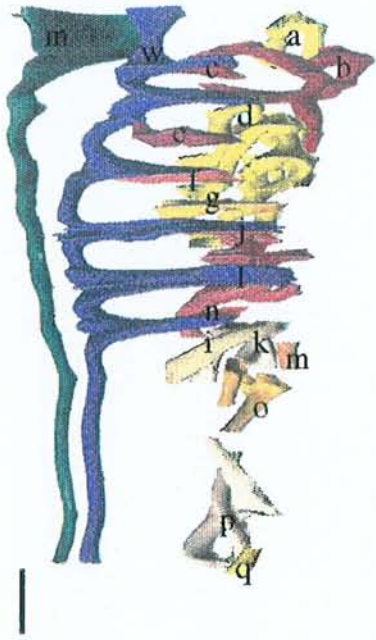
12j 7p	v	s	d	a
l a	111,4	217,5	338,3	108
l b	5,5	14,5	30,3	94
l c	64,9	138,6	235,9	77
l d	143,5	308,7	528,8	77
l e	1,7	5,3	12,8	93
i f	82,2	137,5	183,2	
l g	91,8	220,7	422,4	98
i h	117,7	221,5	332,0	42
i i	165,4	197,7	188,1	9
i j	64,5	416,3	2138,6	37
i k	98,7	189,2	289,0	31
w	490,4	924,5	1387,8	
m	377,4	808,2	1377,9	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

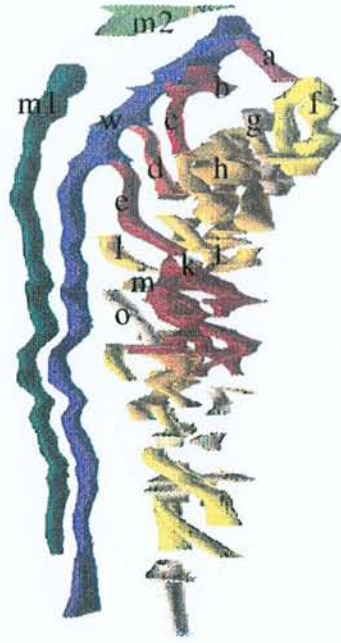
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.



8



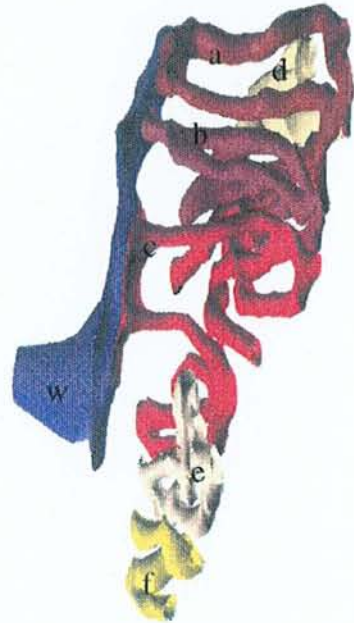
9



10



11



12

Figure 65 : Mésonéphros 8 à 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 femelles de 12,5 jours (échelle : 40 μm pour les mésonéphros 8 à 9, 20 μm pour les mésonéphros 10 et 11 et 70 μm pour le modèle 12).

Tableau 23 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 8 à 12 d'embryons de 12,5 jours.

12j 8p	v	s	d	a
i a	294,6	133,6	48,2	38
l b	110,5	279,8	563,9	88
l c	4,8	23,3	89,5	88
i d	82,5	197,2	375,6	31
l e	95,7	26,6	5,9	92
l f	31,7	70,1	123,4	65
i g	163,0	389,1	739,6	51
l h	15,3	57,5	172,0	91
i i	31,3	73,6	138,1	75
l j	164,2	444,9	959,8	96
i k	6,9	15,4	27,7	59
l l	68,5	151,5	266,6	101
i m	57,4	124,0	213,3	32
l n	4,9	18,7	57,2	101
i o	34,7	84,6	164,0	37
i p	112,6	259,2	474,8	42
i q	9,4	20,4	35,4	30
w	493,7	1199,4	2320,1	
m	451,4	727,3	932,8	

12j 10p	v	s	d	a
l a	365,3	907,4	1794,6	53
l b	7,8	15,4	24,1	103
l c	6,7	15,4	28,0	62
l d	32,2	64,5	103,1	62
i e	225,9	541,5	1033,5	
i f	109,4	501,8	1831,8	32
i g	6,7	14,6	25,3	24
i h	113,7	178,7	223,6	45
w	419,8	722,2	989,3	

12j 11p	v	s	d	a
i a	1,9	7,0	20,9	83
l (b) b	80,1	194,2	374,7	107
l c	19,3	51,3	108,5	73
i d	31,5	81,8	169,3	73
i e	25,7	64,5	128,7	61
i f	2,0	4,2	6,8	31
i g	15,4	40,8	86,1	165
i h	18,5	44,3	84,3	36
i i	51,5	128,3	254,1	31
i j	2,7	40,6	495,2	35
i k	4,2	11,2	24,1	32
i l	5,8	15,4	32,9	38
i m	2,1	6,9	18,6	86
w	130,3	301,1	554,2	

12j 9p	v	s	d	a
l a	15,1	36,6	70,5	92
l b	27,0	48,9	70,5	54
l c	20,7	56,5	123,2	49
l d	20,0	55,3	121,6	92
l e	210,9	586,2	1296,9	91
i f	35,6	225,0	1131,7	60
i g	53,2	10,1	1,5	99
i h	247,9	278,3	248,8	100
i i	12,3	25,3	41,3	107
i j	139,5	230,6	303,6	62
i k	3,3	8,5	17,3	103
i l	55,1	60,9	53,6	48
i m	27,7	34,4	34,1	29
i n	46,4	111,4	212,9	51
i o	43,9	91,2	151,1	67
i p	75,6	162,2	276,9	63
i q	15,1	97,9	507,0	114
i r	10,5	27,2	56,1	69
i s	13,4	32,4	62,5	111
i t	31,3	67,5	116,1	80
i v	5,0	11,7	22,1	105
i w	18,1	6,5	1,9	81
i x	22,0	47,6	81,9	82
i y	3,7	8,0	13,8	
i z	3,6	10,5	24,6	
i a'	6,0	18,0	43,0	
i b'	58,1	123,4	208,8	53
i c'	74,9	181,6	350,5	80
i d'	2,2	6,0	13,3	
w	430,2	767,7	1090,9	
m1	312,4	571,8	833,3	
m2	31,2	65,7	110,1	

12j 12p	v	s	d	a
l (b) a	337,7	640,0	965,7	94
l (b) b	209,6	435,1	719,1	101
l c	411,2	667,3	862,2	91
i d	139,9	241,4	331,7	120
i e	143,6	276,2	423,1	99
i f	154,7	213,6	234,7	94
w	291,1	441,8	533,8	

v: volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

3.2.2.4. Descriptions des mésonéphros d'embryons murins de 13,5 jours

3.2.2.4.1. Les mésonéphros des 9 embryons mâles

- **les mésonéphros 1, 2 et 3 (1^{ère} portée ; Figure 66, Tableau 24)**

Les mésonéphros 1 et 2 sont caractérisés par des bifurcations rostrales des tubules mésonéphritiques :

- dans le mésonéphros 1, en *la* et *lb* avec un volume respectivement de $178.8 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ et $136.5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$,
- dans le mésonéphros 2 en *la* et en *lc* avec *ld* avec un volume respectivement de $248 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ et de $114.8 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

La portion rostrale du mésonéphros 3 présente un aspect contourné. Le tubule *la* est très complexe, avec un volume de $438.6 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, et rejoint le canal de Wolff sans s'y lier. Certains tubules mésonéphritiques sont devenus linéaires, mais d'autres présentent encore un enroulement caudogyre. Les tubules isolés sont caudaux, prennent des formes coudées et se rassemblent dans une même zone sous les tubules mésonéphritiques.

- **les mésonéphros 4, 5 et 6 (2^{ème} portée ; Figure 67, Tableau 25)**

Le mésonéphros 4 présente 3 bifurcations et chacun des tubules conserve une extrémité distale spiralée.

La portion rostrale des mésonéphros 5 et 6 se caractérise par une transformation des tubules mésonéphritiques contournés en tubes droits.

Dans le mésonéphros 5, l'extrémité distale du tubule *la* est très spiralée, mais son extrémité proximale se réduit à un tube droit. De même, le tubule *lb* présente toujours une bifurcation qui se termine par 2 branches courtes et linéaires.

Dans le mésonéphros 6, les extrémités proximales des tubules sont linéaires, seules les tubules les plus caudaux ont leur extrémité distale encore contournée.

De plus, pour ces 3 mésonéphros, des tubules isolés rostraux apparaissent *ib* pour le mésonéphros 4, *if* pour le mésonéphros 5 et *ic* pour le mésonéphros 6. Le mécanisme de régression est aussi observable sur l'extrémité rostrale du canal de Müller du mésonéphros 6.

- **les mésonéphros 7, 8 et 9 (3^{ème} portée ; Figure 67, Tableau 25)**

Le mésonéphros 7 présente 2 bifurcations *la* et *le* avec des branches linéaires sans avoir un enroulement caudogyre ou rostogyre. Parmi les différents tubules mésonéphritiques, des tubules isolés rostraux contournés sont observables et ressemblent à des spirales caudogyres *ic* et *id*.

Le mésonéphros 8 comprend :

- un premier tubule avec une bifurcation (*la*, *lc*),
- un second tubule *lb* dont l'extrémité distale est très contournée,
- et un troisième tubule *ld* court et droit à proximité d'un tubule isolé rostral *ie*.

Le mésonéphros 9 se caractérise :

- par un tubule rostral connecté au canal de Wolff, très développé, de 270 μm de longueur,
- par 3 tubules mésonéphritiques courts de 39.7 à 54.8 μm de longueur,
- et par 17 tubules isolés dont les plus rostraux sont très convolutés.

3.2.2.4.2. Les mésonéphros de 3 embryons femelles

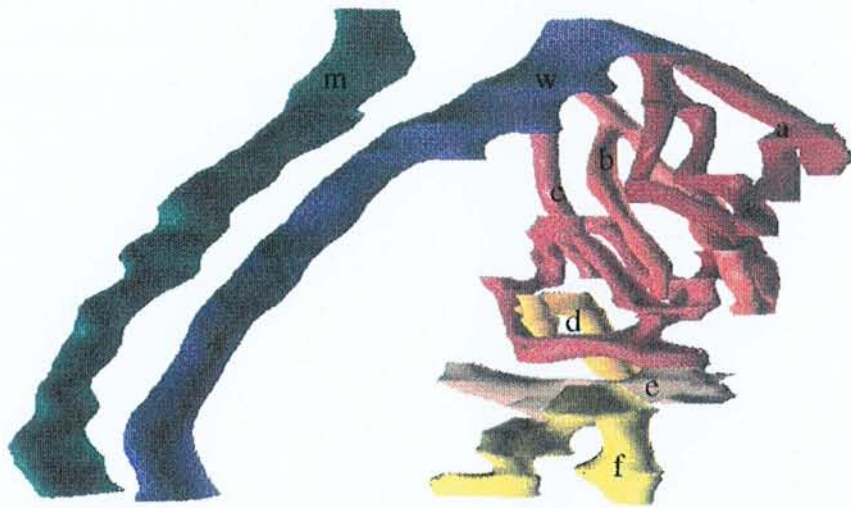
- **les mésonéphros 10, 11 et 12 (4^{ème} portée ; Figure 68, Tableau 26)**

Dans les mésonéphros 10 et 11, il apparaît 3 bifurcations dont les branches s'interconnectent entre elles. Ces connexions donnent à la portion rostrale de ces mésonéphros femelles une organisation réticulée volumineuse avec $456.7 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ et $166.9 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ de volume respectivement.

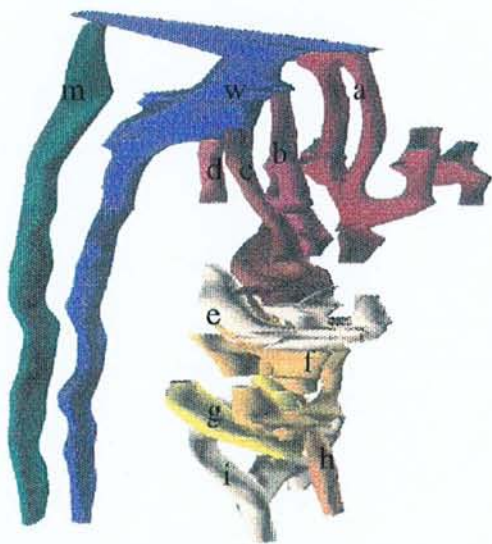
Les 2 tubules les plus rostraux du mésonéphros 12, *la* et *lb*, sont convolutés et semblent avoir perdu leur bifurcation car l'extrémité du tubule rejoint le canal de Wolff sans s'y lier. Les tubules *lc* et *ld* sous-jacents sont courts et droits, entourés par des tubules isolés.

3.2.2.4.3. Conclusion

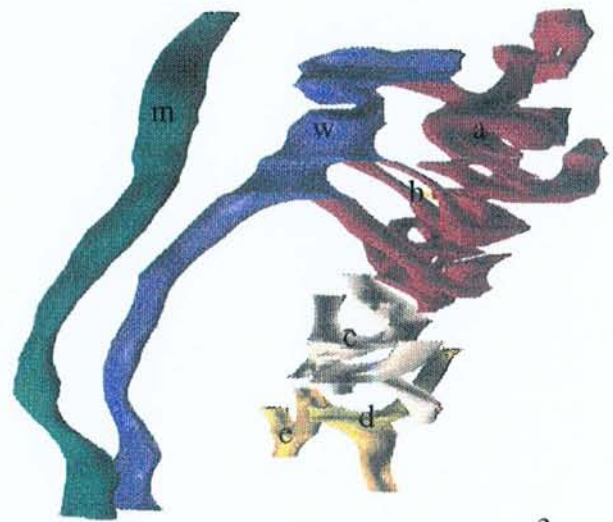
La région tubulaire des mésonéphros mâles et femelles est plus petite, car elle recouvre environ 500 μm alors que, dans le stade précédent, elle pouvait dépasser les 1000 μm . A 11,5 et 12,5 jours, les tubules isolés sont des tubes droits au début, puis prennent les formes successives d'un J puis d'un S. A 13,5 jours, les tubules isolés ont leur forme en S qui s'étale dans l'axe médio-latéral. De plus, dans les mésonéphros mâles de 4 à 9, les tubules isolés sont présents dans la région caudale, mais aussi dans la région rostrale du mésonéphros. Cette observation a été aussi constatée au stade précédent sur les mésonéphros 4 à 9. Il semblerait que ces mésonéphros soient assez proches. D'ailleurs, le mésonéphros 9 de 12,5 jours présente un début de régression rostrale du canal de Müller comme le mésonéphros 4 de 13,5 jours. La présence de tubules isolés dans la portion rostrale de ces mésonéphros serait le produit de la régression de certains tubules rostraux. Les mésonéphros droits mâles se différencient des mésonéphros droits femelles par l'organisation des tubules mésonéphritiques.



1



2



3

Figure 66 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 13,5 jours (échelle : 25 μ m).

Tableau 24 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons de 13,5 jours.

13j 1p	v	s	d	a
l (b)a	178,8	395,2	695,4	92
l (b)b	136,5	247,2	356,4	107
l c	157,3	459,7	1069,2	85
i d	63,6	141,3	249,8	102
i e	98,7	176,6	251,4	53
i f	101,2	177,2	247,0	87
w	407,4	533,5	556,3	
m	342,0	499,7	581,2	

13j 2p	v	s	d	a
l (b) a	248	423	574,5	83
l b	152,4	160,1	133,9	62
l c	101,7	224,6	394,9	78
l d	13,1	28,8	50,4	49
i e	170,4	294,9	406,6	77
i f	126,7	176,9	196,6	95
i g	104,3	182,8	255,2	90
i h	10,9	101,7	754,9	98
i i	177,1	328,9	486,3	116
w	500,3	827,1	1088,6	
m	529,8	764,1	877,5	

13j 3p	v	s	d	a
l (r) a	438,6	1039,8	1962,6	108
i b	10,7	25,1	46,7	90
i c	156,2	373,2	709,8	75
i d	24,2	72,4	172,3	106
i e	76,4	148,3	229,0	80
w	281,7	489,3	676,6	
m	263,1	413,4	517,3	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

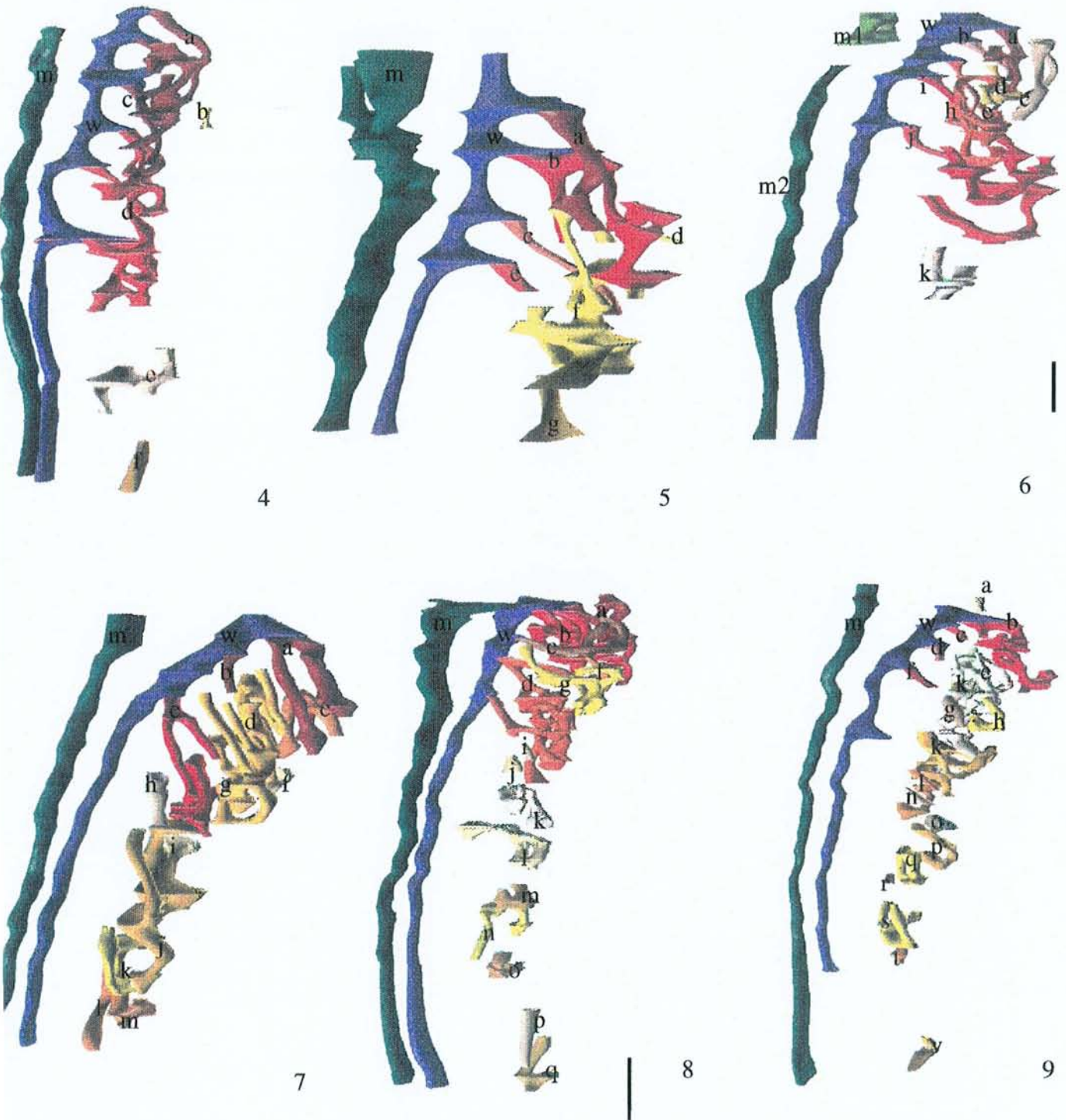


Figure 67 : Mésonéphros 4 à 9 d'embryons mâles de 13,5 jours (échelle : 30 μ m pour les mésonéphros 4 à 7 et 50 μ m pour les mésonéphros 8 et 9).

Tableau 25 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 9 d'embryons de 13,5 jours.

13j 4p	v	s	d	a
l (r)	123,5	338,6	739	83
i b	3,4	11,4	30,7	33
l (b) c	42,9	140,8	367,8	73
l (r)	255,2	629,4	1235,8	80
i e	82,7	167,3	269,4	76
i f	25,1	48,9	75,8	14
w	889,2	708,6	449,6	
m	407	622,1	757	

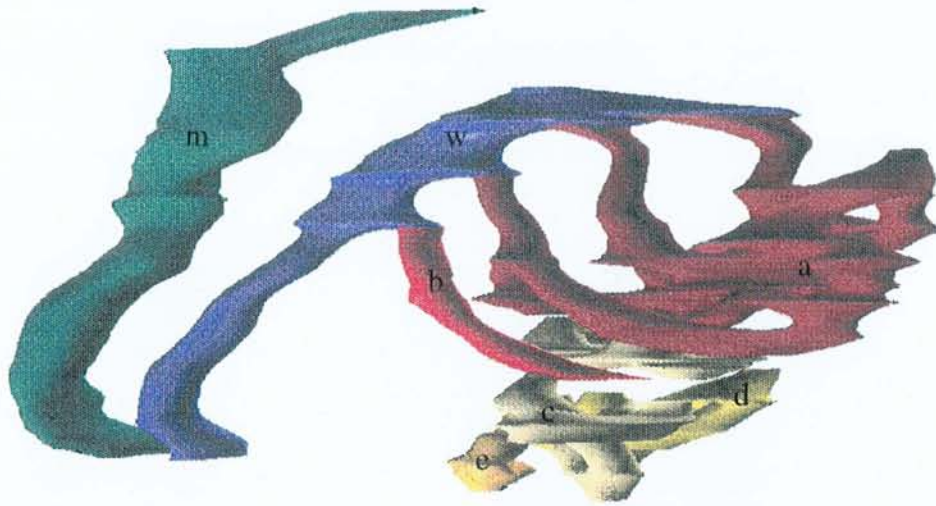
13j 5p	v	s	d	a
l a	49,2	106,8	184,6	97
l (b) b	91,4	231,7	467,7	104
l c	172,8	406,9	762,8	70
i d	1	7,4	43,5	110
l e	15,9	54,4	148,1	70
i f	5,2	17,5	47,3	77
i g	29,4	59,6	96,3	52
w	626,7	404,6	208	
m	517,2	663,4	677,5	

13j 6p	v	s	d	a
l a	31,7	86,6	188,3	57
l b	12,4	42,7	117	81
i c	41,3	119,5	275,4	42
i d	12,1	37,3	91,7	53
i e	1	2,9	7,1	115
i f	5,5	19,8	56,9	64
i g	4,7	17,7	53,2	28
l h	179,5	274,9	335,2	63
l i	126,6	302,3	574,8	76
l j	129,6	291,1	520,7	81
i k	71,1	146,1	239,1	40
w	418,2	697,4	926	
m1	81,2	54	28,6	
m2	313,3	555,6	784,5	

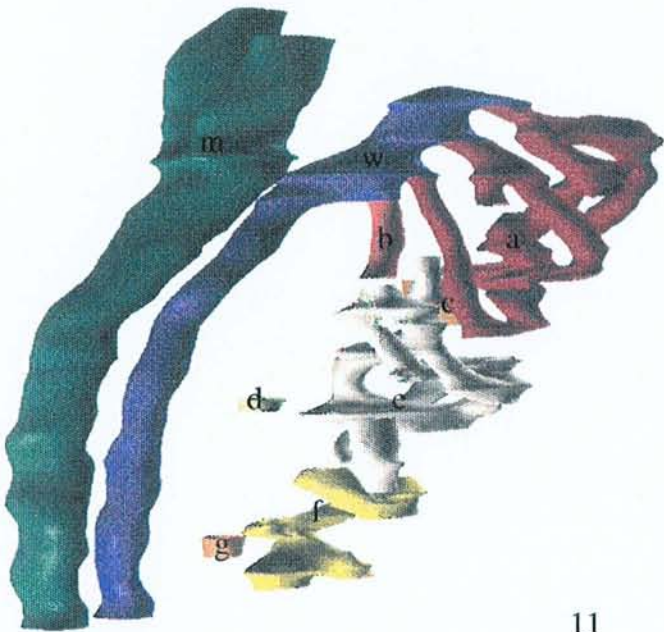
13j 7p	v	s	d	a
l (b) a	114,4	256,7	458,9	111
l b	7,2	22	53,8	70
i c	391,8	623,3	789,5	80
i d	39,6	96,4	186,7	63
l (b) e	41,9	274,1	1429,4	81
i f	21,4	49,1	89,6	91
i g	1,5	5,7	17,2	133
i h	18,8	41	71,4	71
i i	239,6	456,3	692	80
i j	11,7	33,3	75,3	65
i k	9,3	112,8	1088,9	59
i l	80,9	158,1	246,1	69
i m	5,3	14,2	30,2	
w	295,8	520,4	728,9	
m	303,9	495,3	642,5	

13j 8p	v	s	d	a
l (b) a	59,0	135,6	248,4	72
l b	48,9	124,0	250,4	66
l c	18,7	284,4	3450,9	56
l d	54,2	138,6	282,3	51
i e	16,4	43,8	92,9	23
i f	158,7	265,2	352,9	39
i g	229,8	491,8	838,0	54
l h	3,2	11,6	33,2	74
i i	9,4	18,7	29,7	
i j	49,3	109,8	194,7	19
i k	101,4	214,7	361,9	40
i l	32,7	56,7	78,3	24
i m	0,2	3,2	41,5	
i n	43,0	149,9	416,0	25
i o	32,7	75,9	140,5	18
i p	29,6	60,4	98,0	48
i q	40,8	87,9	150,5	59
w	744,6	885,7	838,8	
m	688,6	1057,0	1291,8	

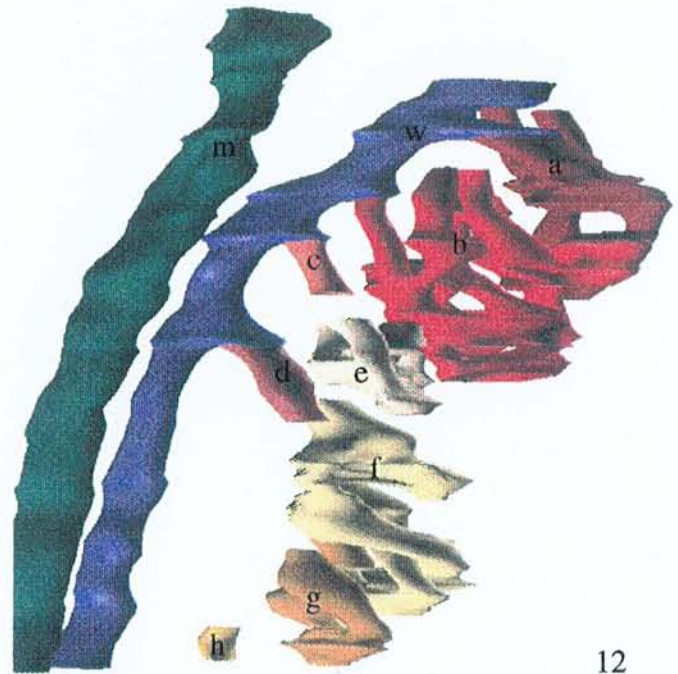
13j 9p	v	s	d	a
i (b) a	8,8	18,7	31,6	75
l b	246,9	294,2	279,0	124
l c	4,2	14,7	41,2	85
l d	8,6	20,6	39,7	78
i e	263,5	655,4	1298,2	102
l f	8,0	23,5	54,8	87
i g	2,2	7,0	18,1	47
i h	36,0	92,8	190,6	69
i i	1,7	38,3	704,3	70
i j	0,8	3,4	11,8	
i k	339,9	118,7	33,0	11
i l	6,0	22,6	67,6	35
i m	77,0	127,0	166,8	67
i n	13,2	35,3	75,2	85
i o	206,7	42,0	6,8	61
i p	61,2	140,6	257,0	95
i q	55,1	118,7	203,7	111
i r	3,6	10,2	22,8	
i s	89,9	197,2	344,1	111
i t	14,2	31,8	56,4	75
i v	29,1	58,4	93,4	100
w	539,8	647,0	617,4	
m	631,5	921,2	1069,9	



10



11



12

Figure 68 : Mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 13,5 jours (échelle : 10 μm pour le mésonéphros 10 et 30 μm pour les mésonéphros 11 et 12).

Tableau 26 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 13,5 jours.

13j 10p	v	s	d	a
l (r) a	456,7	873,8	1331,1	155
l b	33,9	90,8	193,7	177
i c	175,1	329,8	494,6	93
i d	150,6	261,2	360,6	45
i e	105,0	205,3	319,7	33
w	335,5	502,0	598,2	
m	655,4	801,6	780,5	

13j 12p	v	s	d	a
l (r) a	166,9	319,7	487,6	103
l b	18,2	39,1	67,0	48
i c	27,1	42,7	53,7	95
i d	21,5	19,6	14,3	13
i e	272,7	742,3	1608,7	
i f	146,7	247,5	332,3	24
i g	11,8	16,2	17,7	30
w	360,8	509,6	573,2	
m	784,2	822,1	686,1	

13j 10p	v	s	d	a
l (pr) a	146,5	292,8	466,0	113
l (pr) b	386,5	638,6	840,2	71
l c	9,1	20,3	35,9	76
l d	24,0	44,5	65,7	93
i e	116,5	209,4	299,7	103
i f	314,4	526,8	702,8	106
i g	122,3	220,8	317,5	106
i h	7,0	16,4	30,8	44
w	160,8	466,3	1076,4	
m	500,1	641,3	654,8	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

3.2.2.5. Descriptions des mésonéphros d'embryons murins de 14,5 jours

3.2.2.5.1. Les mésonéphros de 9 embryons mâles

- **les mésonéphros 1, 2 et 3 (1^{ère} portée ; Figure 69, Tableau 27)**

Le mésonéphros 1 est constitué de 4 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff, 3 d'entre eux présentent une bifurcation : *la*, *lb* et *ld*. Les branches tubulaires, à la suite des bifurcations, ont un enroulement caudogyre, sauf la branche la plus rostrale au niveau de la seconde bifurcation qui est rostogyre.

Dans le mésonéphros 2, l'extrémité latérale des tubules joignant le canal de Wolff ne présente plus la forme de bifurcation, mais l'extrémité médiale de ces tubules est fragmentée *la*, *lb* et *ld*. Cet aspect fragmenté des tubules permet de supposer que le tubule isolé *if* pourrait provenir du tubule *ld* et *ig* de *le*.

Dans le mésonéphros 3, seuls 2 tubules persistent, le plus rostral *la* présente encore des bifurcations.

L'observations de ces 3 mésonéphros permet de constater que les tubules mésonéphritiques les plus rostraux sont ceux qui persistent et que les tubules se concentrent au pôle rostral du canal de Wolff.

- **les mésonéphros 4, 5 et 6 (2^{ème} portée ; Figure 70, Tableau 28)**

Dans le mésonéphros 4, le tubule le plus rostral *la* présente une structure réticulée, ce qui est surprenant car jusqu'à ce stade, ce type de structure n'avait été rencontrée que dans les mésonéphros femelles. L'apparition d'une telle structure peut s'expliquer par un mécanisme mis en place pour dégager des tubules isolés rostraux des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff. Ce stade intermédiaire pourrait donc participer à la différenciation des tubules et à la formation du rete testis chez le mâle.

Les tubules mésonéphritiques du mésonéphros 5 apparaissent à la suite de bifurcation *la* et *lc* et sont réduits à de longs tubes droits dont les extrémités médiales sont fragmentées. En position caudale des tubules liés au canal de Wolff, 2 petits tubules isolés persistent.

Dans le mésonéphros 6, seul un tubule mésonéphritique très contourné persiste avec de nombreux tubules isolés.

- **les mésonéphros 7, 8 et 9 (3^{ème} portée ; Figures 70 et 71, Tableaux 28 et 29)**

Ces 3 mésonéphros ont leurs tubules mésonéphritiques concentrés au pôle rostral du canal de Wolff et peuvent contenir jusqu'à 13 tubules isolés.

3.2.2.5.2. Les mésonéphros des 3 embryons femelles

- **les mésonéphros 10, 11 et 12 (4^{ème} portée ; Figure 71, Tableau 29)**

L'extrémité rostrale du canal de Müller se termine en entonnoir. L'organisation réticulée des tubules mésonéphritiques rostraux a disparu. Les extrémités médiales des tubules ne sont plus interconnectées. Des points de régression sont observables par la présence du tubule *if* dans le mésonéphros 11 et des tubules isolés, *ia* et *id*, dans le mésonéphros 12 (Figure 76).

3.2.2.5.3. Conclusion

Les mésonéphros d'embryons mâles 7 à 9 correspondent à un stade de maturation plus tardif que les autres, du fait d'un plus grand nombre de tubules isolés. Plus le nombre de tubules isolés serait grand, plus le processus de régression, au niveau rostral, est avancé. Ce phénomène apparaît au niveau des mésonéphros 3 (7 tubules isolés et 2 tubules liés), 6 (7 tubules isolés et 1 tubule lié), 9 (13 tubules isolés et 3 tubules liés) et 8 (10 tubules isolés et 3 tubules liés). Les mésonéphros des embryons femelles ont leurs tubules qui se réduisent à de simples tubes droits.

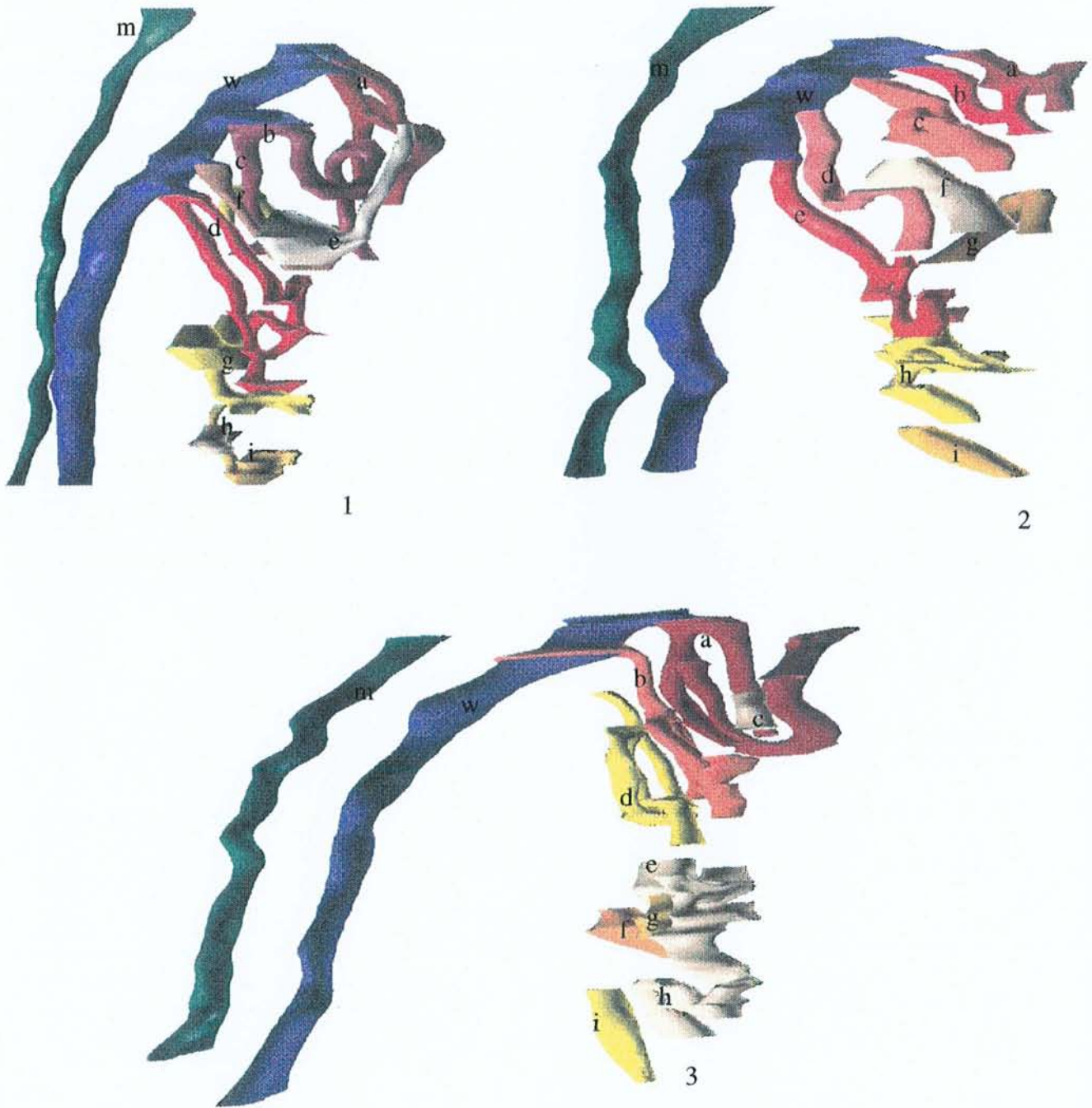


Figure 69 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 14,5 jours (échelle : 30 μ m).

Tableau 27 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons de 14,5 jours.

14j 1p	v	s	d	a
l (b) a	145,0	292,2	468,8	101
l (b) b	235,0	289,0	283,0	89
l c	37,2	98,6	208,0	53
l (b) d	162,3	408,8	820,2	90
i e	119,2	188,2	236,7	123
i f	33,2	71,4	122,2	94
i g	162,9	208,1	211,6	96
i h	30,5	57,7	86,8	
i i	14,1	105,2	623,5	64
w	400,3	771,3	1183,1	
m	145,5	324,4	575,8	

14j 2p	v	s	d	a
l a	56,7	121,6	207,7	85
l b	55,1	116,8	197,0	86
l c	142,2	255,2	364,5	90
l d	35,5	157,1	554,0	63
l e	169,9	247,7	287,4	87
i f	114,2	144,6	145,9	75
i g	57,7	111,5	171,7	71
i h	137,7	281,8	459,1	144
i i	66,2	95,1	108,8	105
w	889,1	909,5	740,8	
m	270,1	489,4	706,0	

14j 3p	v	s	d	a
l a	178,8	398,5	707,1	65
l b	116,8	270,9	500,1	66
i c	14,3	26,7	39,5	
i d	99,8	99,1	78,3	57
i e	80,0	276,5	760,9	112
i f	85,5	119,4	132,8	72
i g	22,3	48,5	84,2	78
i h	315,3	479,1	579,6	72
i i	44,5	74,6	99,6	77
w	305,1	484,6	612,9	
m	243,6	421,4	580,4	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

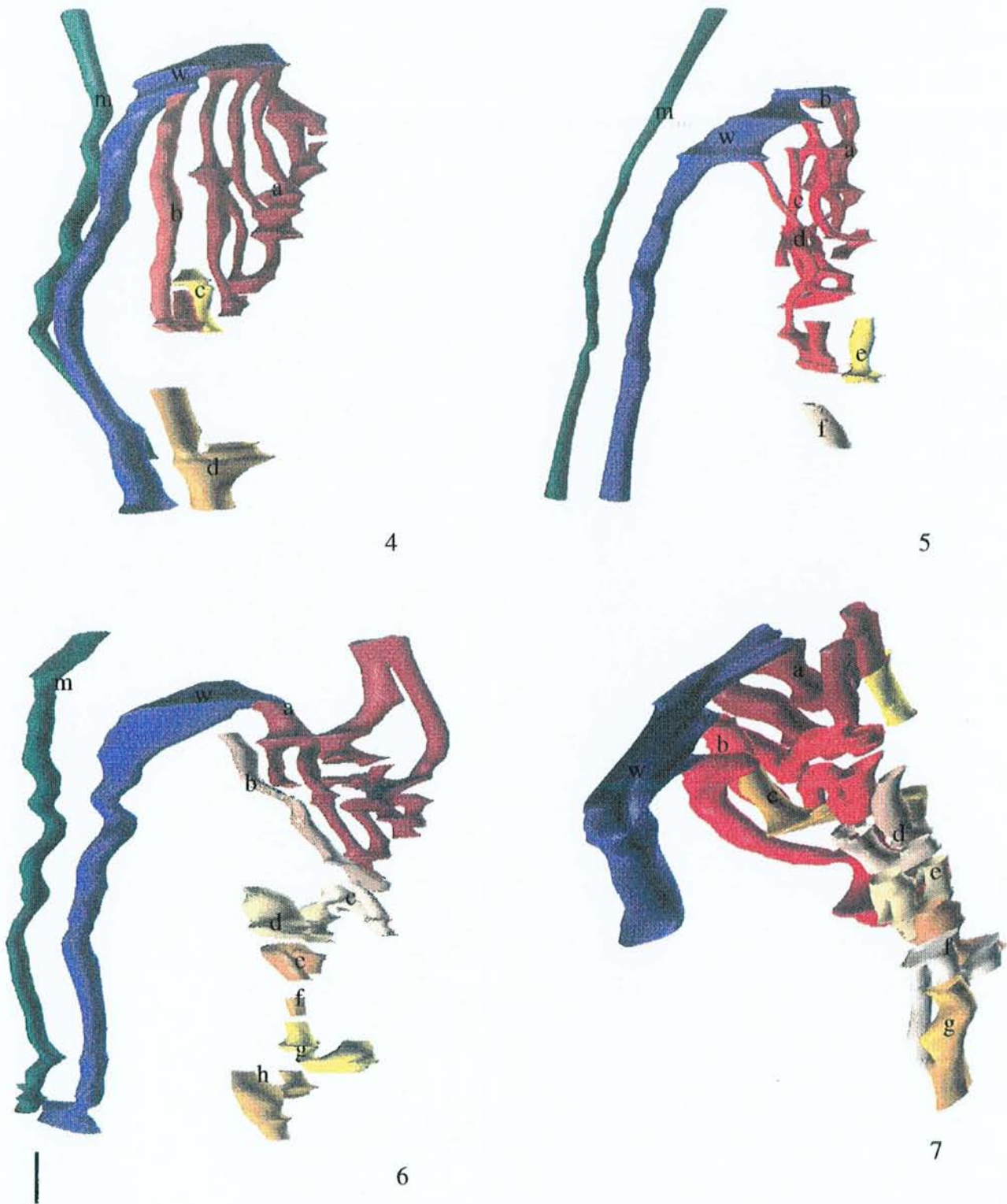


Figure 70 : Mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 14,5 jours (échelle : 35 μ m).

Tableau 28 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 14,5 jours.

14j 4p	v	s	d	a
l a	364,1	804,2	1414,0	83
l b	42,3	203,1	776,7	77
i c	69,1	85,2	83,7	97
i d	130,1	173,3	183,8	103
w	717,3	860,1	821,0	
m	247,7	452,3	657,3	

14j 5p	v	s	d	a
l a	8,4	17,7	29,5	
l b	108,3	308,7	700,5	71
l c	200,9	559,8	1242,2	77
l d	126,0	273,3	472,0	82
i e	72,2	132,2	192,8	95
i f	36,4	58,1	73,9	90
w	566,6	852,6	1021,3	
m	183,0	419,0	763,8	

14j 6p	v	s	d	a
l a	471,3	799,2	1079,1	111
i b	76,0	188,9	374,1	96
i c	44,9	118,8	250,2	106
i d	150,5	256,6	348,3	101
i e	73,1	127,9	178,0	98
i f	1,0	12,4	123,0	63
i g	97,5	143,8	168,8	87
i h	145,9	206,6	232,8	86
w	830,6	991,6	942,6	
m	391,1	674,5	926,3	

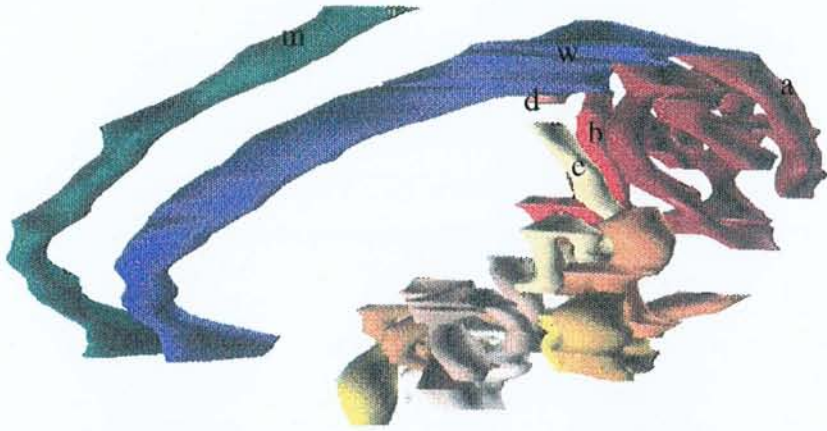
14j 7p	v	s	d	a
l a	202,6	427,0	716,4	73
l b	273,6	438,1	558,5	102
i c	60,7	102,5	137,8	99
i d	29,0	54,1	80,2	72
i e	755,2	951,8	955,1	85
i f	74,7	176,5	332,2	93
i g	24,7	117,5	444,8	80
w	996,0	1137,2	1033,8	
m	203,2	391,8	601,4	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

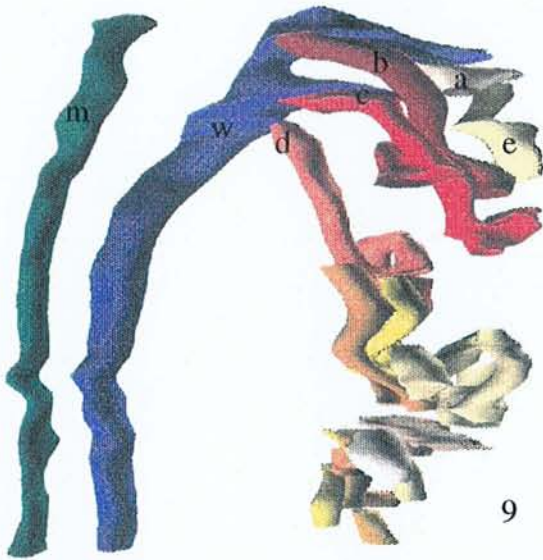
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

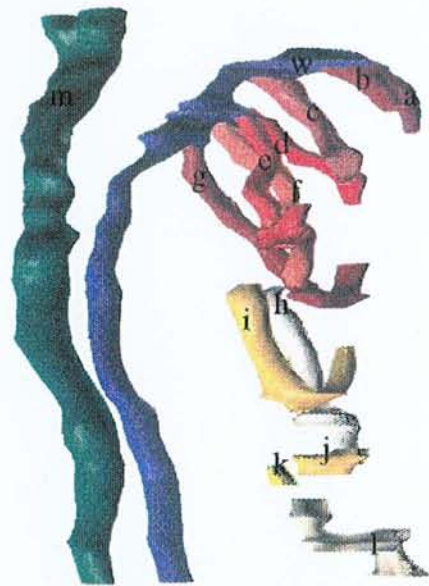
a : l'angle formé en degré.



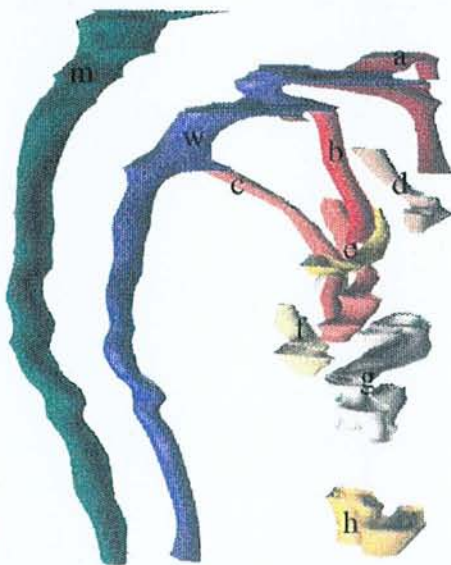
8



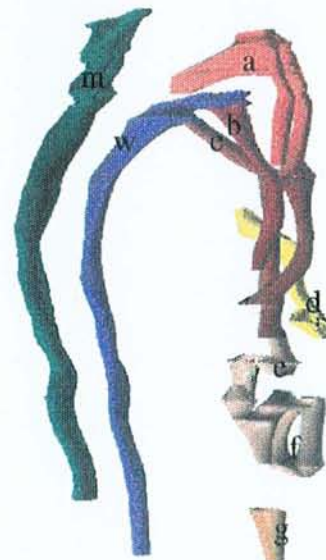
9



10



11



12

Figure 71 : Mésonéphros 8 et 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 14,5 jours (échelle : 35 μ m).

Tableau 29 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 8 à 12 d'embryons de 14,5 jours.

14j 8p	v	s	d	a
l a	881,4	867,7	680,1	42
l b	142,5	273,0	416,3	116
l d	67,5	135,3	215,9	87
i e	2,0	4,1	6,6	
i f	125,0	212,9	288,5	76
i g	154,7	197,7	201,2	57
i h	125,2	103,1	67,6	106
i i	19,0	269,3	3045,2	103
i j	32,9	240,9	1406,5	86
i k	308,1	267,2	184,5	109
i l	163,8	210,5	215,5	125
i m	1,5	8,9	42,7	91
i n	10,1	9,5	7,1	113
w	998,4	1000,1	797,6	
m	512,9	732,4	832,5	

14j 9p	v	s	d	a
i a	175,1	50,8	11,7	118
l b	91,3	179,9	282,3	118
l c	171,3	294,0	401,7	127
l d	233,1	253,0	218,6	86
i e	65,4	108,7	143,8	24
i f	151,6	229,0	275,4	83
i g	161,8	186,2	170,5	64
i h	176,0	319,8	462,8	85
i i	137,4	58,1	19,6	58
i j	52,5	113,2	194,3	77
i k	41,6	68,1	88,7	99
i l	31,4	60,4	92,4	99
i m	16,3	27,0	35,6	28
i n	41,3	62,8	76,0	18
i o	128,6	87,4	47,2	86
i p	33,8	55,3	72,0	
w	856,1	920,0	787,2	
m	366,3	521,2	590,3	

14j 10p	v	s	d	a
l a	35,6	64,7	93,6	102
l b	21,9	43,6	68,9	95
l c	77,5	158,4	257,6	110
l d	96,2	116,3	112,0	95
l e	59,5	132,4	234,3	122
l f	128,3	120,9	90,7	102
l g	74,8	163,2	283,4	99
i h	94,8	168,2	237,5	91
i i	156,5	242,7	299,6	87
i j	23,1	38,8	51,7	75
i k	7,1	14,2	22,7	97
i l	329,4	139,0	46,7	91
w	273,0	599,5	1048,1	
m	676,7	788,8	732,0	

14j 11p	v	s	d	a
l a	215,4	172,2	109,6	96
l b	55,6	105,7	160,1	103
l c	136,3	282,0	464,3	83
l d	68,3	97,2	110,1	80
l e	75,1	100,6	107,4	118
i f	71,3	120,1	161,0	83
i g	264,9	418,7	526,9	36
i h	44,6	153,1	418,5	97
w	390,9	673,7	924,4	
m	721,0	833,7	767,5	

14j 12p	v	s	d	a
i a	197,9	327,3	431,0	
l b	57,1	123,5	212,5	122
l c	162,4	310,1	471,5	122
i d	198,0	327,4	430,9	124
i e	101,7	164,5	211,8	98
i f	167,2	389,1	721,0	88
i g	33,6	51,4	62,6	66
w	322,4	502,9	624,6	
m	640,2	791,1	778,4	

v : volume du tubule x 10³ en µm³,s : sa surface x 10² en µm²,

d : sa distance en µm,

a : l'angle formé en degré.

3.2.2.6. Descriptions des mésonéphros d'embryons murins de 15,5 jours

3.2.2.6.1. Les mésonéphros de 9 embryons mâles

- **les mésonéphros 1, 2 et 3 (1^{ère} portée ; Figure 72, Tableau 30)**

Les tubules mésonéphritiques, essentiellement linéaires, sont liés au canal de Wolff par leur extrémité médiale bouclée. Les tubules se rassemblent dans la portion la plus rostrale du canal de Wolff avec une orientation qui varie entre 70° et 90°. Sur ces derniers, à l'endroit où les tubules sont liés au canal de Wolff, il se constitue de petites cavités bien visibles dans les mésonéphros 1 et 2 ; comme si les tubules s'anastomosaient pour participer à la formation du futur rete testis. Les tubules isolés se trouvent à proximité des extrémités médiales des tubules mésonéphritiques :

- dans le mésonéphros 1, *if* et *ig* sont proches de *le*,
- dans le mésonéphros 2, *ig*, *ih* et *ii* sont localisés aux extrémités médiales des tubules mésonéphritiques,
- dans le mésonéphros 3, *ie*, *if* et *ig* sont distants les uns des autres, mais restent situés aux extrémités médiales des tubules mésonéphritiques.

- **les mésonéphros 4, 5 et 6 (2^{ème} portée ; Figure 73, Tableau 31)**

Les mésonéphros mâles 4 à 6 ont, eux aussi, leurs tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff, qui se rassemblent dans la portion rostrale, mais, ils sont curvilinéaires et contournés, avec une orientation qui s'échelonne entre 30 et 110°.

- **les mésonéphros 7, 8 et 9 (3^{ème} portée ; Figures 73 et 74, Tableaux 31 et 32)**

Les mésonéphros 7 à 9 présentent les mêmes caractéristiques que les mésonéphros 4 à 6.

3.2.2.6.2. Les mésonéphros de 3 embryons femelles

- **les mésonéphros 10, 11 et 12 (4^{ème} portée ; Figure 74, Tableau 32)**

Dans les mésonéphros femelles 10 à 12, les tubules isolés sont rares, 2 ou moins, et les tubules liés sont linéaires, voire rudimentaires. L'angle des tubules isolés varie de 60 à 100°.

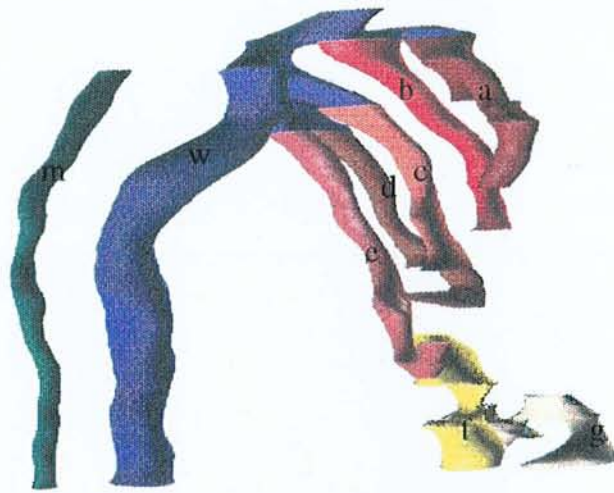
Le mésonéphros 11 montre un reste de structure réticulée *ld* qui a totalement disparu dans les 2 autres mésonéphros 10 et 12. De plus, sur ce mésonéphros 11, le canal de Wolff présente un début de régression.

3.2.2.6.3. Conclusion

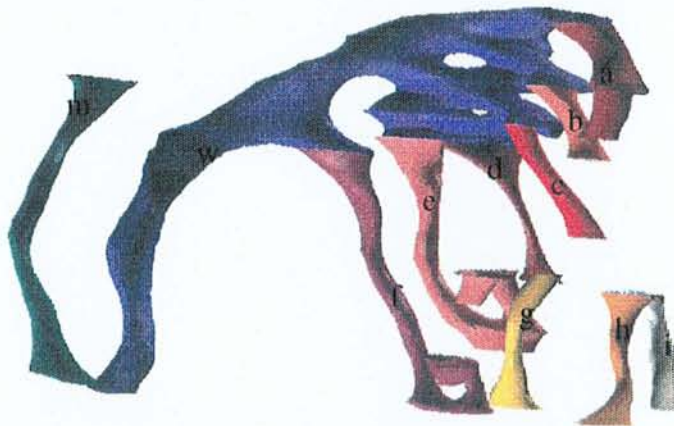
Les mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles permettent de visualiser la concentration rostrale des extrémités latérales des tubules mésonéphritiques.

Les mésonéphros 4 à 9 montrent que les tubules mésonéphritiques se concentrent dans la portion rostrale du mésonéphros et qu'ils se réduisent à des tubes droits.

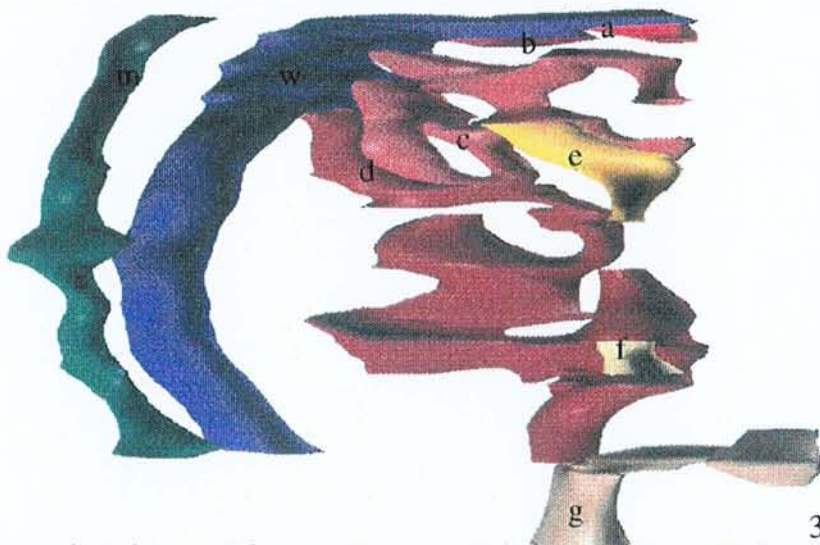
Les mésonéphros d'embryons femelles présentent des points de régression plus nombreux au niveau des tubules droits et courts, du canal de Wolff (mésonéphros 11), tubules isolés rostraux (mésonéphros 10). De plus, le canal de Wolff est moins volumineux que le canal de Müller.



1



2



3

Figure 72 : Mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 15,5 jours (échelle : 40 μ m).

Tableau 30 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 1 à 3 d'embryons mâles de 15,5 jours.

15j 1p	v	s	d	a
l (b) a	109,7	176,4	225,9	87
l b	108,3	171,4	216,1	96
l c	73,0	142,0	220,0	88
l d	70,7	155,9	273,9	86
l e	92,3	185,7	297,5	75
i f	83,9	139,5	184,8	112
i g	177,9	209,9	197,2	121
w	613,1	694,2	625,8	
m	90,4	215,7	409,9	

15j 2p	v	s	d	a
l a	48,3	93,3	143,3	63
l b	20,4	39,7	61,5	76
l c	22,4	53,9	103,0	112
l d	26,5	83,2	207,7	110
l e	110,4	169,4	207,0	92
l f	57,1	149,6	312,2	83
i g	22,8	59,6	124,1	47
i h	19,1	54,7	124,8	45
i i	14,9	42,5	96,6	54
w	540,7	851,0	1066,3	
m	69,4	167,6	322,3	

15j 3p	v	s	d	a
l a	8,4	22,7	49,0	70
l b	6,2	15,4	30,3	98
l c	215,5	382,9	541,7	91
l (r)d	511,3	746,7	868,2	73
i e	11,2	23,5	39,1	87
i f	45,6	89,1	138,7	
i g	22,5	188,9	1262,8	66
w	627,9	691,5	606,3	
m	153,4	302,7	475,5	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,
d : sa distance en μm ,
a : l'angle formé en degré.

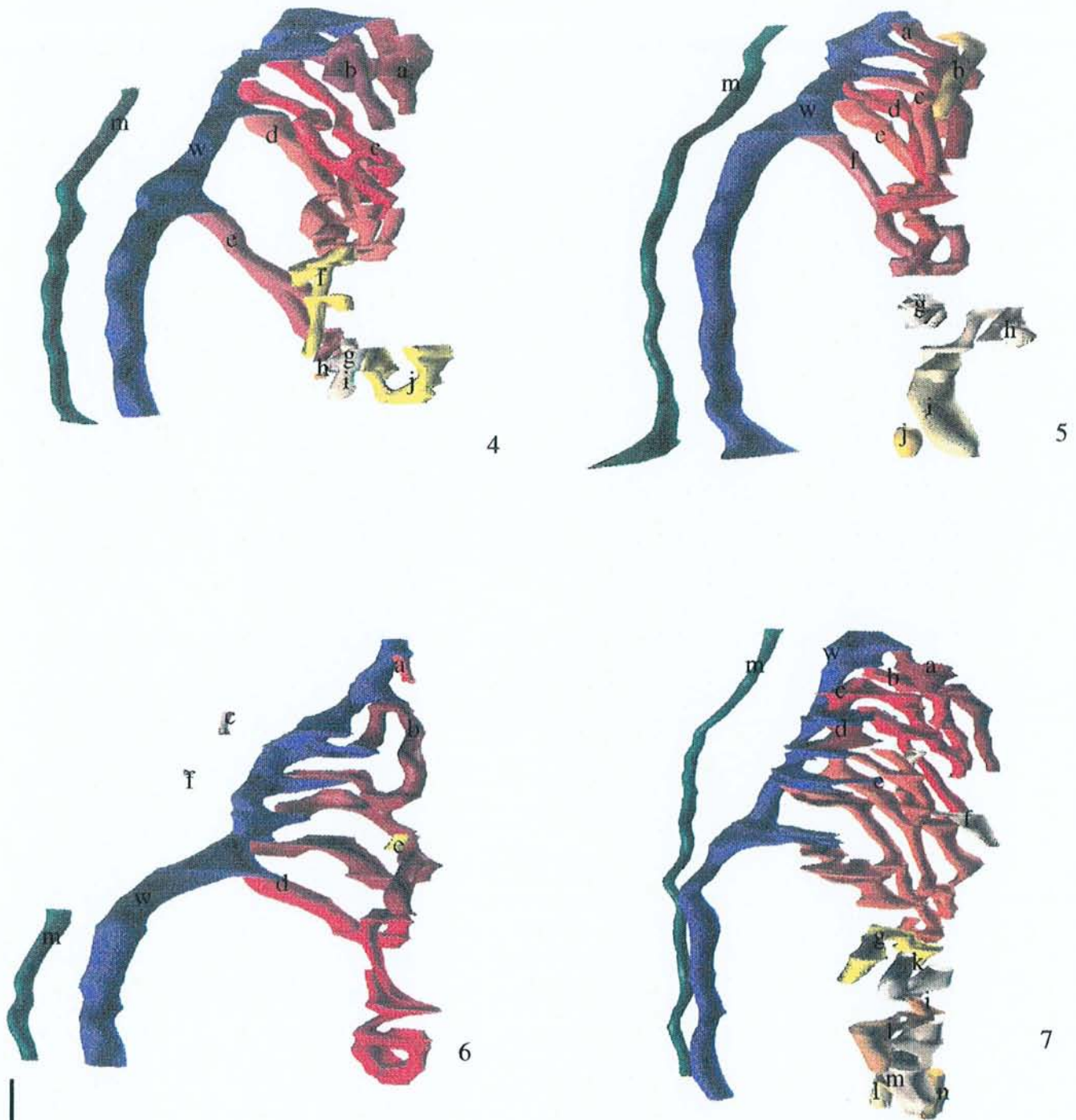


Figure 73 : Mésonéphros 4 à 7 d'embryons mâles de 15,5 jours (échelle : 30 μ m).

Tableau 31 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 4 à 7 d'embryons de 15,5 jours.

15j 4p	v	s	d	a
l a	110,6	162,6	190,4	103
l b	92,9	179,3	275,6	110
l c	185,1	365,1	573,4	75
l d	236,0	405,1	553,6	96
l e	91,7	208,7	378,3	90
i f	131,1	51,2	15,9	41
i g	76,3	157,0	257,1	100
i h	27,9	34,6	34,1	93
i i	0,7	2,5	7,2	24
i j	8,1	21,0	43,5	54
w	545,2	764,6	853,9	
m	135,9	282,7	468,3	

15j 5p	v	s	d	a
l a	131,9	255,0	392,4	91
i b	43,5	88,5	143,5	44
l c	95,3	185,3	286,9	112
l d	102,0	220,2	378,4	111
l e	108,7	210,6	325,0	97
l f	198,2	287,8	332,6	85
i g	80,3	153,6	233,9	49
i h	434,6	164,6	49,6	92
i i	175,5	202,6	186,2	66
i j	22,8	34,6	42,0	45
w	744,1	900,1	866,9	
m	191,1	410,1	700,6	

15j 6p	v	s	d	a
l a	4,5	13,0	29,5	39
l b	19,1	43,4	78,6	37
i c	3,6	9,8	21,5	32
l d	179,8	419,3	778,6	95
i e	1,6	7,6	28,6	63
i f	0,9	3,1	8,2	53
w	536,7	749,9	834,4	
m	52,0	111,6	190,8	

15j 7p	v	s	d	a
l a	897,4	303,8	81,9	92
l b	50,1	204,9	666,7	91
l c	228,2	461,4	742,8	109
l d	400,9	943,4	1767,7	116
l e	21,6	56,0	115,7	99
i f	60,9	139,3	253,8	124
i g	149,9	249,6	331,1	35
i h	99,5	151,5	183,6	84
i i	5,7	14,5	29,0	47
i j	87,1	167,5	256,5	39
i k	68,9	90,8	95,1	21
i l	71,9	113,6	142,9	21
i m	32,6	55,1	74,2	25
i n	18,1	27,7	33,7	76
w	737,2	1146,2	1418,7	
m	115,4	313,4	677,5	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,
s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,
d : sa distance en μm ,
a : l'angle formé en degré.

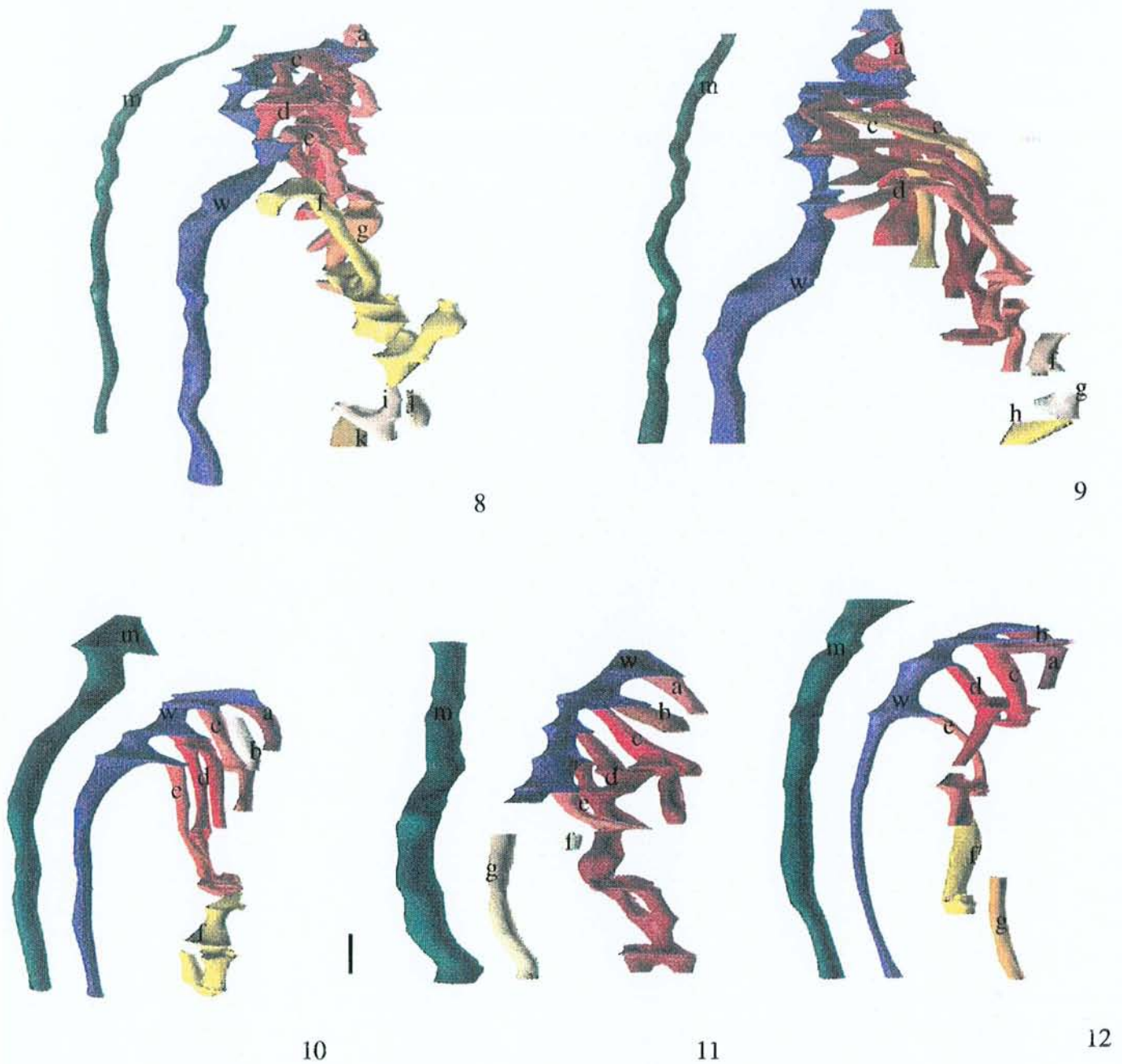


Figure 74 : Mésonéphros de 8 à 9 d'embryons mâles et mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles de 15,5 jours (échelle : 35µm).

Tableau 32 : Caractéristiques morphométriques des mésonéphros 8 à 12 d'embryons de 15,5 jours.

15j 8p	v	s	d	a
l a	252,3	519,1	850,3	127
l b	113,6	757,9	4027,1	121
l c	197,3	373,8	563,7	115
l d	10,0	405,4	13083,2	147
l e	212,1	373,6	523,8	137
i f	450,5	801,2	1134,4	88
i g	22,8	44,9	70,5	70
i h	155,1	173,6	154,8	49
i i	23,9	42,3	59,5	42
i j	43,2	59,2	64,7	35
i k	106,2	137,2	141,2	9
w	654,7	959,1	1118,6	
m	157,1	364,4	673,1	

15j 9p	v	s	d	a
l a	166,8	303,4	439,5	108
l b	5,1	17,8	49,3	105
l c	598,3	1127,7	1692,1	106
l d	127,6	276,8	478,1	27
i e	116,9	378,8	976,7	43
i f	53,6	87,8	114,6	23
i g	31,0	49,9	64,0	74
i h	28,4	57,4	92,3	
w	1170,8	823,5	461,1	
m	152,1	329,5	568,5	

15j 10p	v	s	d	a
l a	32,0	60,6	91,3	107
l b	56,4	116,8	192,5	93
l c	33,6	197,3	923,4	103
l d	107,1	216,3	347,7	107
i e	24,5	50,4	82,7	92
i f	371,4	372,7	297,8	65
w	304,5	525,8	722,9	
m	629,6	712,0	641,0	

15j 11p	v	s	d	a
l a	16,2	36,6	66,1	99
l b	23,4	44,3	66,7	64
l c	57,2	98,0	133,6	101
l (b) d	445,4	565,5	571,7	92
l e	16,2	45,8	102,7	97
i f	5,3	12,9	24,8	35
i g	46,2	96,1	159,4	73
w	233,7	329,0	368,7	
m	418,8	473,5	426,3	

15j 12p	v	s	d	a
l a	51,9	103,2	163,4	98
i b	11,7	16,9	19,4	98
l c	67,9	112,3	148,0	81
l d	120,7	215,9	307,7	86
l e	92,4	167,3	241,4	108
i f	122,1	181,2	214,0	62
i g	56,7	110,8	172,5	57
w	315,6	549,9	762,8	
m	784,8	811,5	668,2	

v : volume du tubule x 10^3 en μm^3 ,

s : sa surface x 10^2 en μm^2 ,

d : sa distance en μm ,

a : l'angle formé en degré.

3.2.3. Analyses statistiques des données

3.2.3.1. Analyse statistique inter-portée pour un même stade embryonnaire

Pour comparer les diverses valeurs prises pour chaque paramètre, dans l'ensemble des 9 mésonéphros mâles (3 portées) et des 3 mésonéphros femelles (une portée), le calcul du test F de l'analyse de la variance a été calculé. Sont sélectionnées pour chaque variable dépendante étudiée : le volume d'un tubule, sa surface, sa longueur calculée et l'angle formé avec le canal de Wolff, les classes sexe et portée, additionnées de l'interaction sexe-portée. Les mesures des paramètres suivis sur chacun des mésonéphros reconstruits, ont été comparées par analyse des variances : ANOVA suivant la procédure GLM¹ (General Linear Models). Cette procédure utilise la méthode des moindres carrés au moyen du système SAS (Statistical Analysis System). Les résultats des analyses statistiques sont présentés dans les Tableaux 1 à 6 de l'Annexe.

- **A 10,5 jours**

- **une différence significative inter-portée** pour la surface des tubules liés (Prob>F) : 0.0037, et pour l'angle des tubules liés (Prob>F) : 0.0039, et non liés (Prob>F) : 0.0008.

Cette différence est expliquée par la modification rapide de l'orientation des tubules. La visualisation des mésonéphros 1, 2, 3 - 7, 8, 9 et 10, 11, 12 des Figures 56 à 58 permet d'appuyer ce résultat. Dès que les tubules émergent du mésonéphros, ils prennent une forme en J, puis en S et s'étendent caudalement. Par ailleurs, les tubules non liés passent eux aussi d'une forme linéaire à la forme d'un J puis d'un S, changeant leur orientation. De plus, les mésonéphros 7, 8, 9 comme 4, 5, 6, sont plus avancés dans leur développement que les mésonéphros 1, 2, 3 et 10, 11, 12.

- **aucune différence significative inter-portée** pour le volume, et la longueur des tubules, n'est décelable.

- **aucune différence mâle-femelle** n'apparaît pour les 4 paramètres suivis.

¹ SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, 1995, Volume2 Chapter24. The GLM Procedure p891-996.

Ces premiers résultats montrent que les mésonéphros de 10,5 jours ne sont pas homogènes quant à l'orientation de leur tubule. Ceci s'expliquerait par l'émergence des tubules qui progressent caudalement et par le fait qu'à ce stade l'évolution est très rapide.

- **A 11,5 jours**

- **aucune différence significative inter-portée** n'est retrouvée pour les 4 paramètres suivis.

- **une différence significative mâle-femelle** apparaît pour le volume des tubules liés (Prob>F) : 0.0144.

En effet, la visualisation des mesures morphométriques et des mésonéphros présentés dans les Figures 60 à 62 montrent que les tubules liés dans les mésonéphros femelles 10, 11, 12 sont plus volumineux que ceux des mésonéphros mâles 1 à 9. Chez les mésonéphros femelles, il s'agit du tubule le plus rostral qui se connecte 4 à 5 fois au canal de Wolff, expliquant l'importance des volumes de certains tubules dans les mésonéphros femelles.

- **A 12,5 jours**

- **une différence significative inter-portée** apparaît au niveau de la surface des tubules liés (Prob>F) : 0.0144 et de l'angle formé par les tubules isolés (Prob>F) : 0.0344.

Cette disparité de la surface des tubules liés peut s'expliquer par des mésonéphros qui sont à un stade de maturation plus tardif, par exemple, les mésonéphros 6, 8 et 9 où les tubules liés rostraux sont réduits. Les tubules isolés rostraux seraient les produits de cette régression (Figures 64 et 65). Les tubules mésonéphritiques descendent du canal de Wolff sous forme de spirales, avec ou sans bifurcations et dans le cas du mésonéphros 10, femelle, le tubule le plus rostral rejoint le canal de Wolff en 3 points sous forme d'un réseau (Figure 65).

D'autre part, les variations d'orientation des tubules isolés trouvent une explication dans l'apparition de 2 types de tubules isolés. Les tubules isolés rostraux proviendraient de la régression des extrémités des tubules voisins liés au canal de Wolff et les tubules caudaux prennent, comme les tubules émergents du canal de Wolff, la forme d'un J puis d'un S.

- **aucune différence significative mâle-femelle** n'est décelable, sans doute parce que les stades étudiés ne sont pas assez homogènes.

L'observation des mésonéphros reconstruits permet de constater que les portées 1 et 4 sont plus jeunes que les portées 2 et 3.

- **A 13,5 jours**

- **une différence significative inter-portée** apparaît au niveau de l'angle formé par les tubules isolés (Prob>F) : 0.0246.

Ce résultat est peut-être lié à des différences d'orientation. Ceci s'expliquerait par le fait, que les tubules isolés caudaux auraient une forme en S avec une origine mésenchymateuse (Sainio *et al*, 1997 [105]), alors que les rostraux prendraient l'orientation de la courbure des tubules liés dont ils proviendraient (Figures 66 à 68).

- **une différence significative mâle-femelle** est visible pour la surface des tubules liés (Prob>F) : 0.0372 et des tubules isolés (Prob>F) : 0.0236, et pour l'angle formé avec les tubules liés (Prob>F) : 0.0149.

Les surfaces des tubules liés et isolés des mésonéphros femelles sont plus importantes que celles des mésonéphros mâles. Dans la portion la plus rostrale des mésonéphros d'embryons femelles, 3 tubules émergent du canal de Wolff. De ces points d'émergence se produisent des bifurcations qui sont à l'origine d'une structure réticulée. Cette structure s'obtient par une interconnexion des extrémités médiales des tubules mésonéphritiques entre eux. Les surfaces des structures réticulées, uniquement présentes dans les mésonéphros femelles, sont donc plus grandes que celle des tubules simples des mésonéphros d'embryons mâles. Les surfaces des tubules isolés dans les mésonéphros 10 à 12 d'embryons femelles sont aussi plus grandes que celles des mésonéphros 4 à 9 d'embryons mâles, car ces derniers ont probablement un stade de maturation plus précoce que ceux des mésonéphros d'embryons femelles. D'ailleurs, les mésonéphros 4 à 9 de 13,5 jours sont très proches des mésonéphros 4 à 9 de 12,5 jours.

D'autre part, dans les mésonéphros femelles, les angles formés au niveau des jonctions des tubules avec le canal de Wolff sont plus ouverts que chez les mâles. Chez les femelles, ils peuvent atteindre 177° alors qu'ils ne dépassent pas 111° chez les mâles. Cette différence s'expliquerait par l'encombrement résultant de l'aspect réticulé qui conditionnerait l'angle des tubules s'interconnectant.

- **A 14,5 jours**

- **aucune différence significative inter-portée** n'est décelée.

- **une différence significative mâle-femelle** apparaît pour la surface des tubules liés (Prob>F) : 0.0196 et l'angle formé avec les tubules liés (Prob>F) : 0.0021. La surface des tubules liés des mésonéphros mâles est plus importante que celle des mésonéphros femelles (Tableaux 27 à 29). Il semblerait que l'orientation des tubules mésonéphritiques diffère selon qu'ils vont participer au rete testis ou au rete ovarii. Ceci est visible pour les stades 13,5 et 14,5 jours.

- **A 15,5 jours**

- **une différence significative inter-portée** est visible pour la surface des tubules liés (Prob>F) : 0.005 et pour l'angle des tubules liés (Prob>F) : 0.0013.

- **aucune différence mâle-femelle** n'apparaît pour ces 4 paramètres. Pour les mésonéphros mâles, les tubules liés se sont concentrés dans la portion rostrale et tendent à s'anastomoser, par leur extrémité latérale, avec le canal de Wolff de manière progressive (mésonéphros 4 à 9, puis, mésonéphros 1 à 3 ; Figures 73 et 74 puis 71). D'autre part, pour les mésonéphros femelles, les tubules liés ont totalement perdu leur aspect contourné pour ne garder qu'une forme linéaire (Figure 74). Cette évolution dans les mésonéphros d'embryons mâles et femelles expliquerait la variation des surfaces et des angles formés entre les portées 1 à 4 (Figures 72 à 74).

En conclusion, cette analyse statistique confirme une différence mâle-femelle dans l'organisation des tubules mésonéphritiques. Au stade 11,5 jours, les différences apparaissent dans la forme (volume des tubules liés) alors qu'en fin de développement, correspondant aux stades 13,5 et 14,5 jours, elles se manifestent non seulement dans la forme (surface) mais aussi dans l'orientation des tubules liés (angle formé).

Cette étude permet aussi d'émettre une critique sur ce travail, le stade 12,5 jours manque d'homogénéité, puisque dans les portées 2 et 3 apparaît le canal de Müller, alors qu'il est absent dans les portées 1 et 4. Il aurait été plus pertinent de diviser ce stade en 12,0 - 12,5 et 12,75 jours afin de discerner des différences significatives mâle-femelle.

3.2.3.2. Analyse statistique inter-stade embryonnaire

Les résultats numériques sont présentés sous forme de moyennes (Tableaux 7 à 16 de l'Annexe) accompagnées de l'erreur standard à la moyenne dans les Figures 75 à 82 suivantes, pour chacun des paramètres des tubules liés et non liés. La validité statistique des différences entre les moyennes de 2 stades successifs est évaluée d'après le test « t » de Fisher-Student par la procédure TTEST². La procédure TTEST permet :

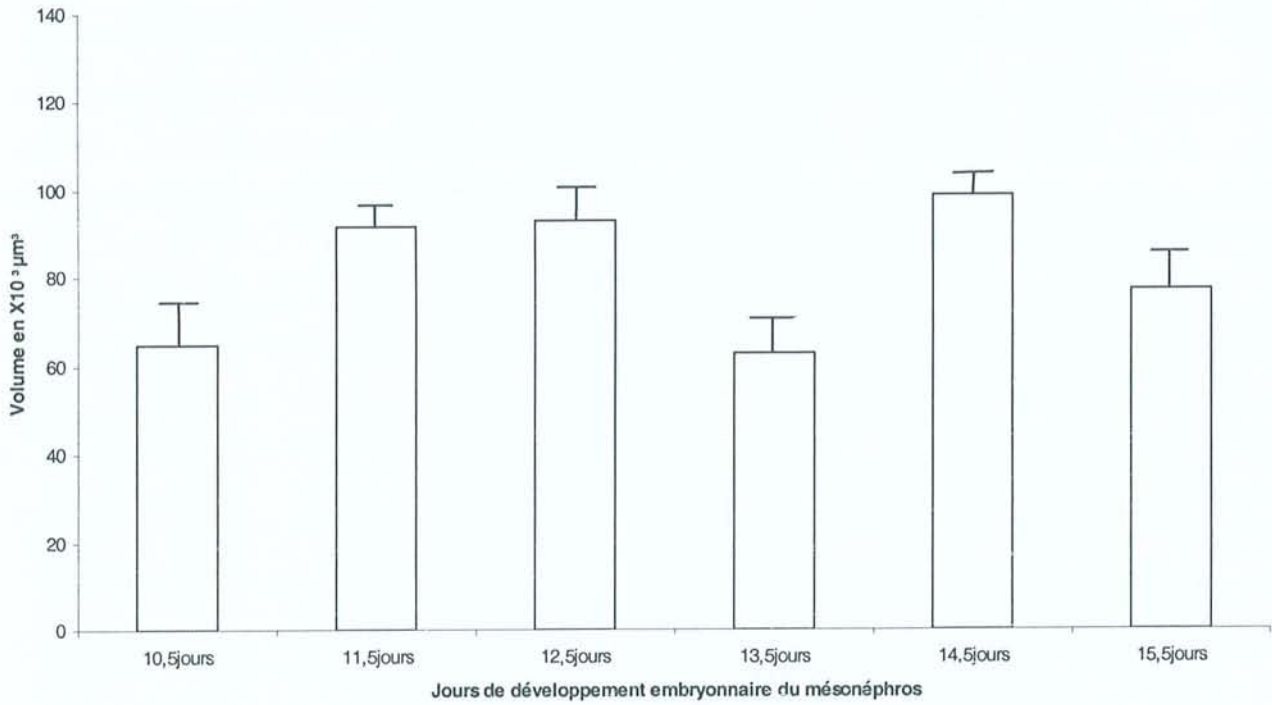
- le calcul des moyennes de chacun des deux groupes d'observations (tubules non liés, isolés et tubules liés) identifiés pour chaque variable (vol., surf., long. et angl.),
- de tester l'hypothèse que les moyennes des populations (par exemple, les observations de 10,5 et 11,5 jours pour un sexe fixé) sont identiques.

Pour les tubules isolés :

Chez les mâles, des différences apparaissent au niveau de l'orientation des tubules. Tout d'abord, entre 10,5 et 11,5 jours, il est observé des différences significatives ($p < 0.05$), avec une inclinaison nette des tubules passant de 90° à 60° qui s'expliquent par le passage de tubes droits le long du canal de Wolff (Figures 56 à 57) à des tubules qui prennent la forme de J puis de S (Figure 57). Les différences sont très significatives ($p < 0.005$) pour l'orientation des tubules isolés entre les stades 11,5-12,5 (60° à 80°), 13,5-14,5 (70° à 90°) et 14,5-15,5 (90° à 60°) jours (Figure 78a). Les différences entre 11,5 et 12,5 jours pourraient s'expliquer par l'apparition de tubules isolés rostraux, à 12,5 jours, qui résulterait d'une régression des extrémités médiales des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff. Entre 12,5 et 13,5 jours, les tubules isolés des mésonéphros 4 à 9 s'étendent le long du mésonéphros de façon similaire dans les 2 portées (Figures 64, 65 et 67). Les différences entre 13,5 et 14,5 jours peuvent s'expliquer par une simplification des tubules, comme si un processus de régression ou de disparition s'opérait aussi sur les tubules isolés. Les différences entre 14,5 et 15,5 jours correspondent à une réduction du nombre de tubules et de leur forme, conditionnant leur orientation.

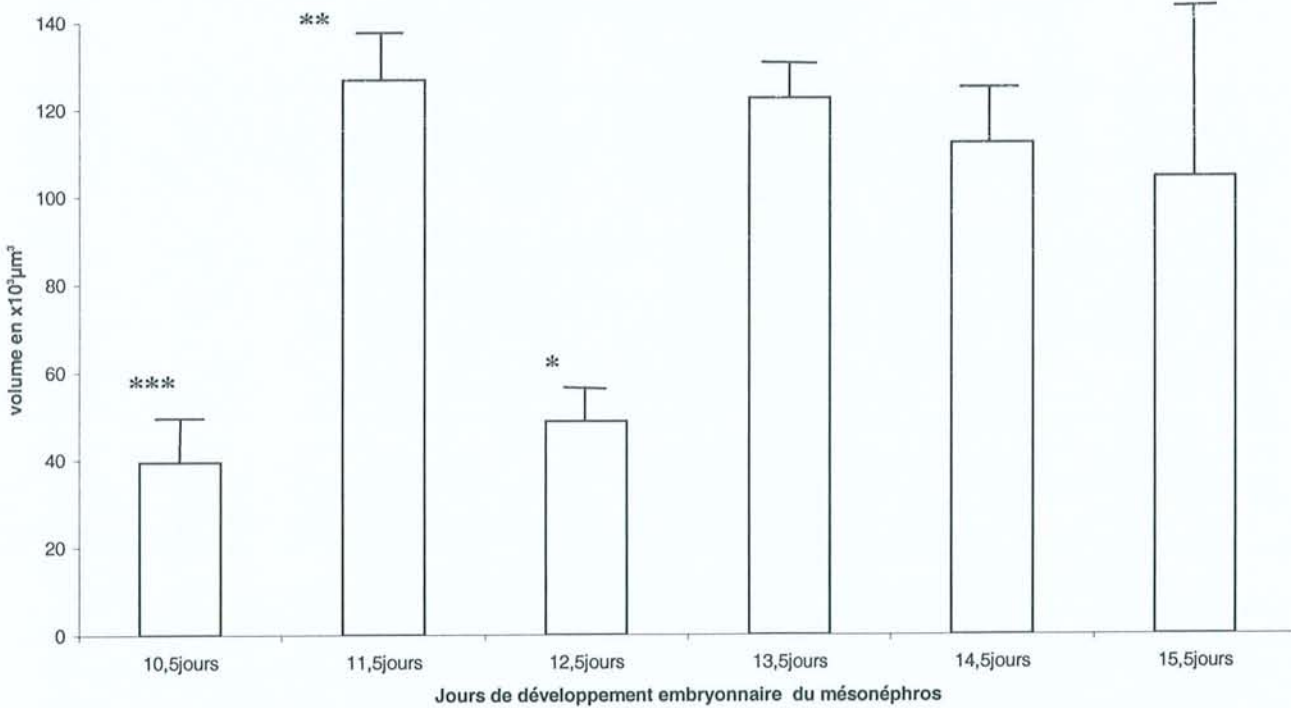
² SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, 1995, Volume2 Chapter42. The TTEST Procedure p1613-1632.

Evolution du volume des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



a

Evolution du volume des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle

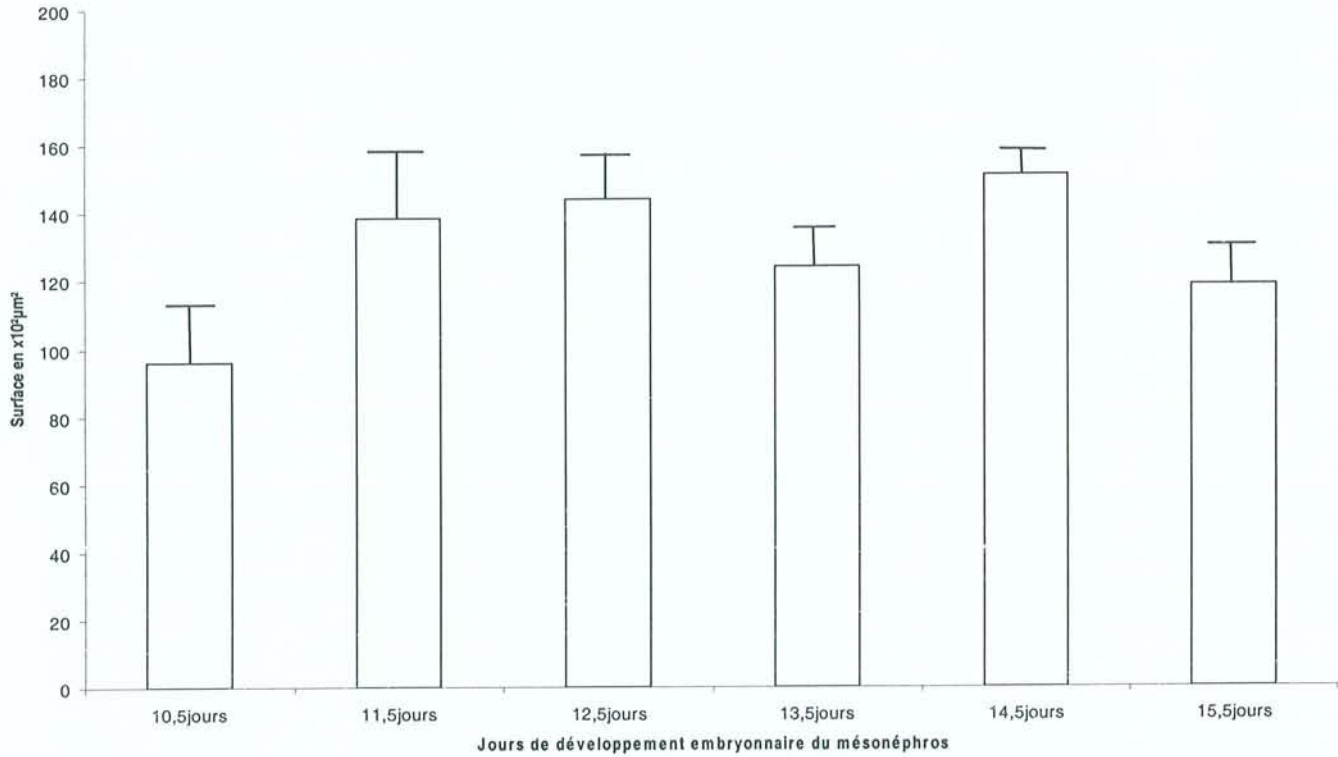


b

Figure 75 : Evolution du volume des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

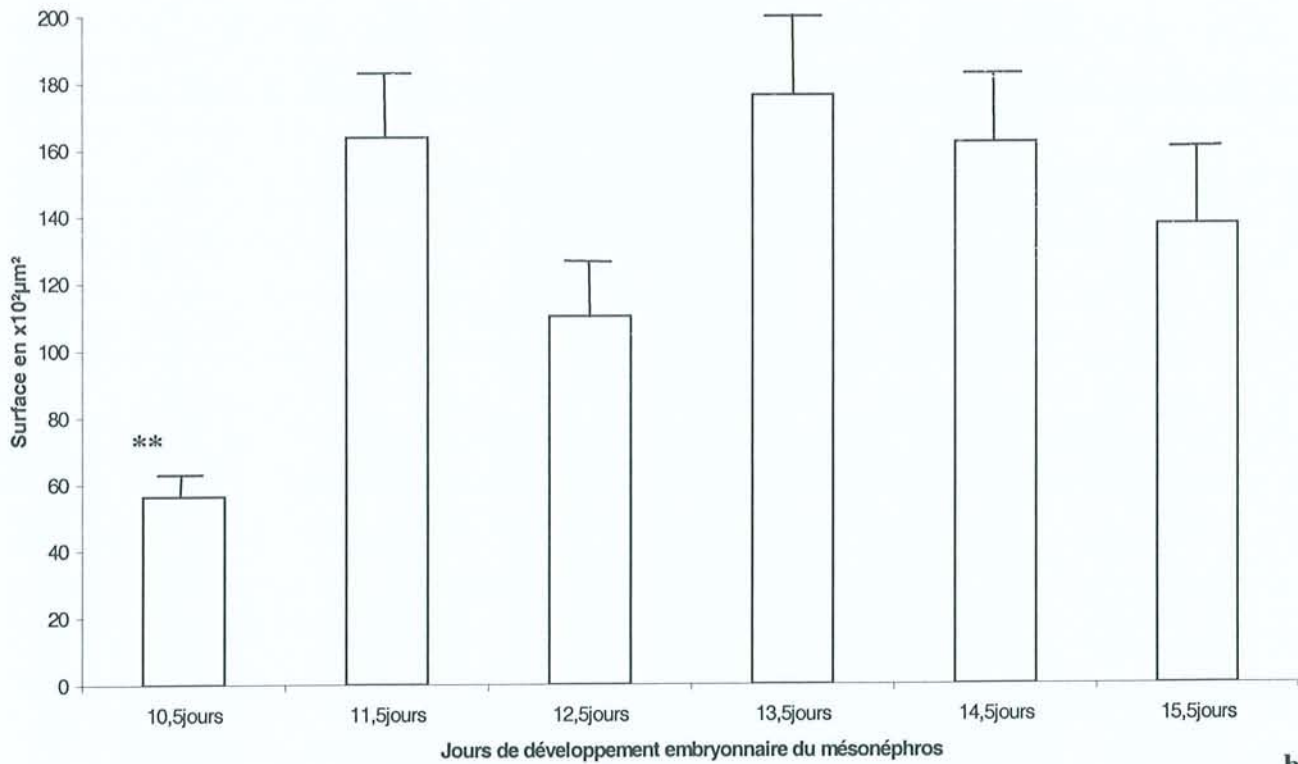
(Résultats numériques sont présentés sous forme de moyennes accompagnées de l'erreur standard à la moyenne, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.005$).

Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle

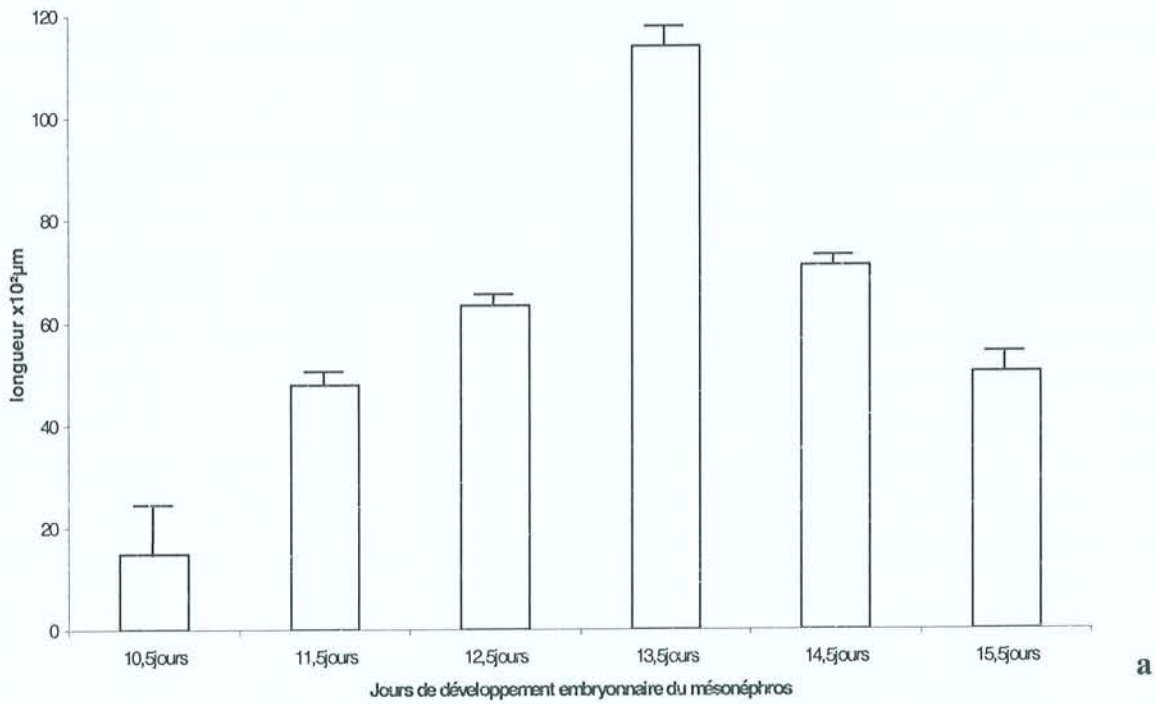
a



b

Figure 76: Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle

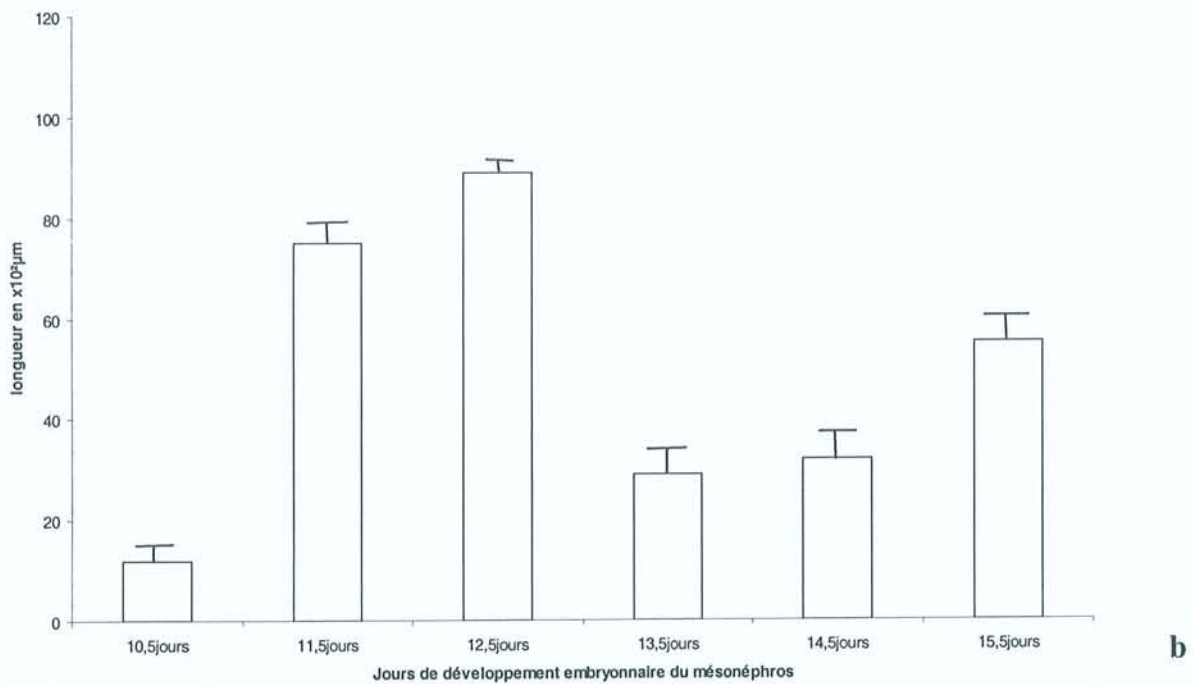
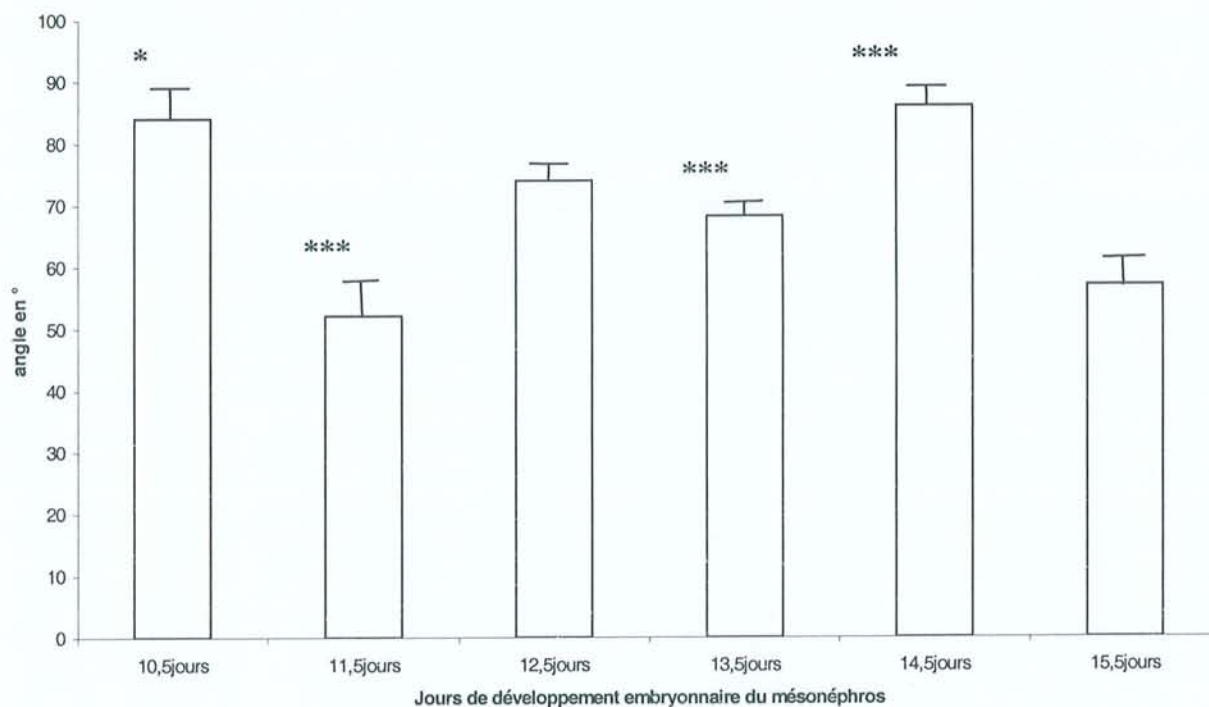


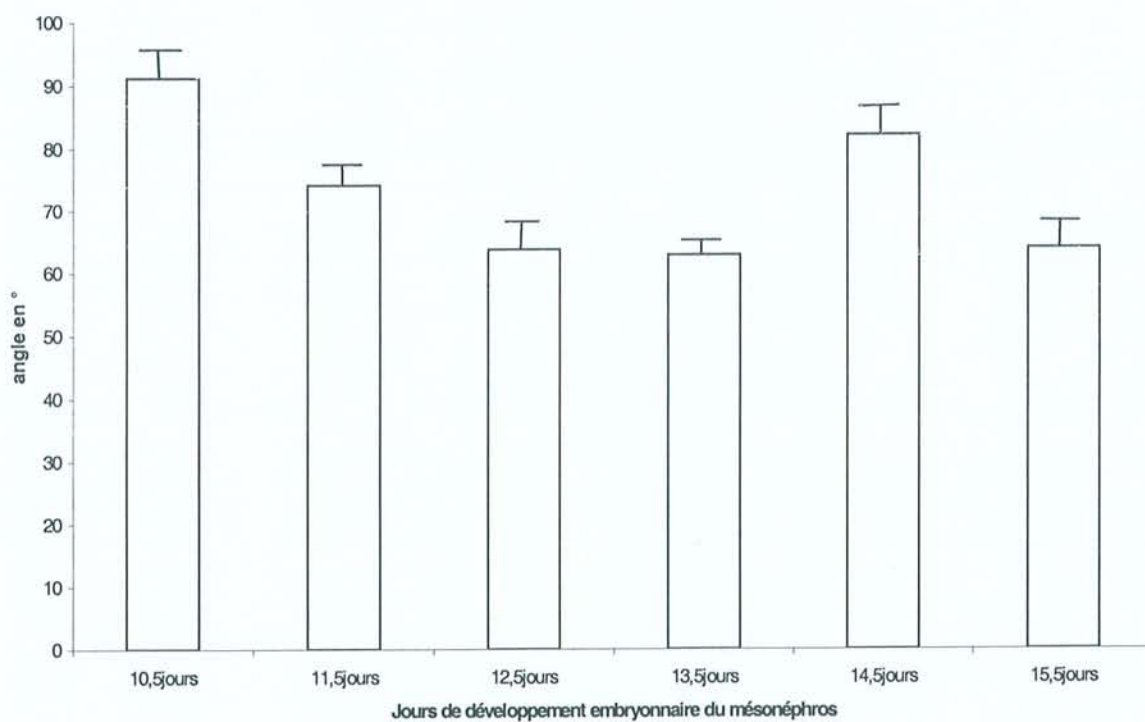
Figure 77 : Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques non liés au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques non liés et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



a

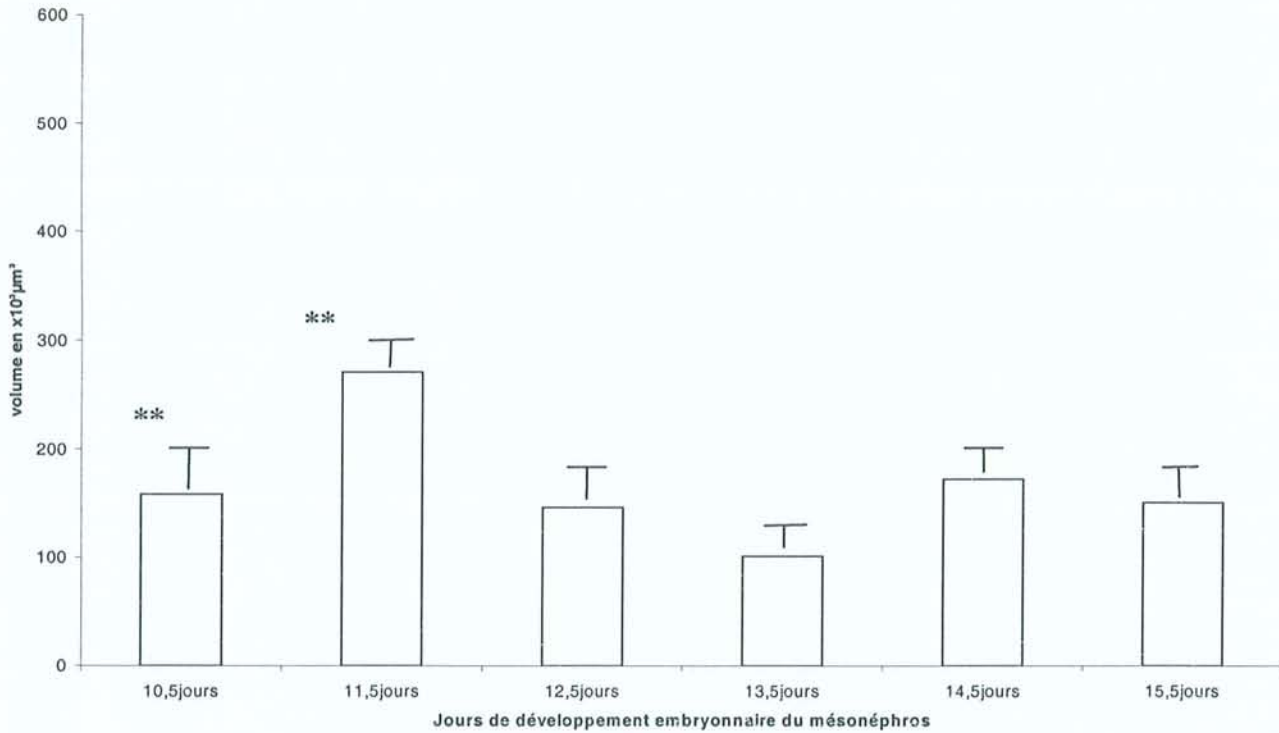
Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques non liés et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle



b

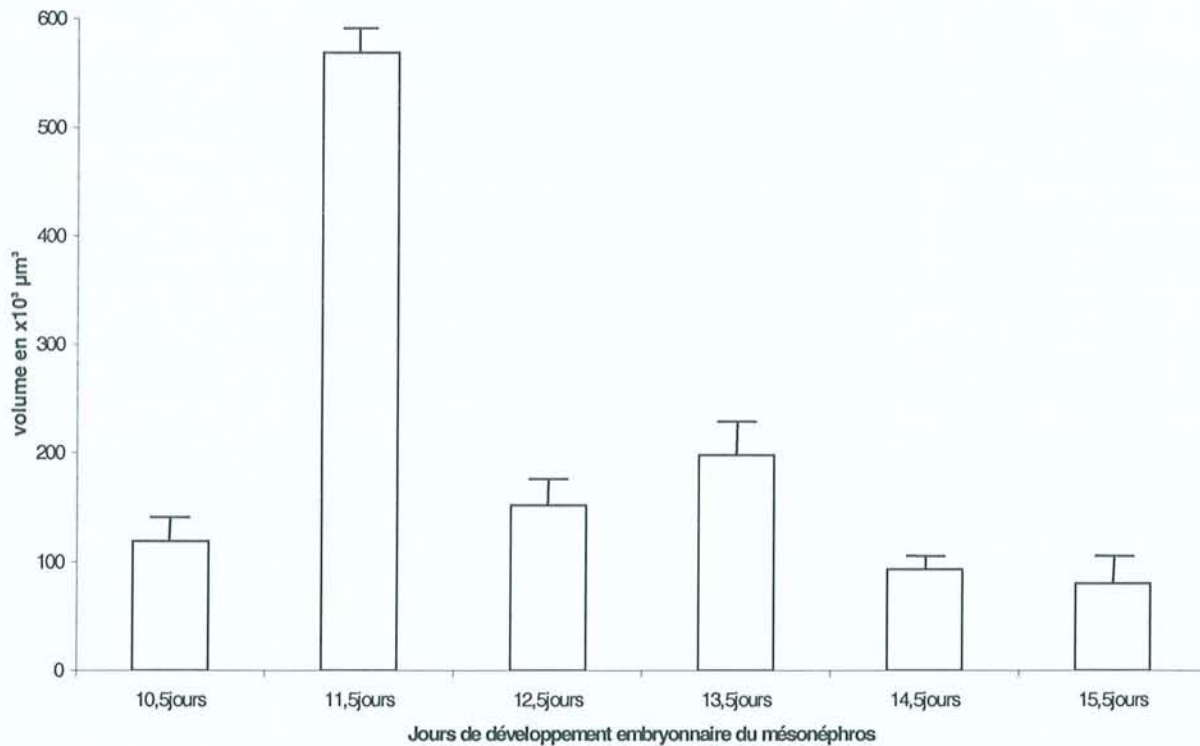
Figure 78 : Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques non liés et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Evolution du volume des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



a

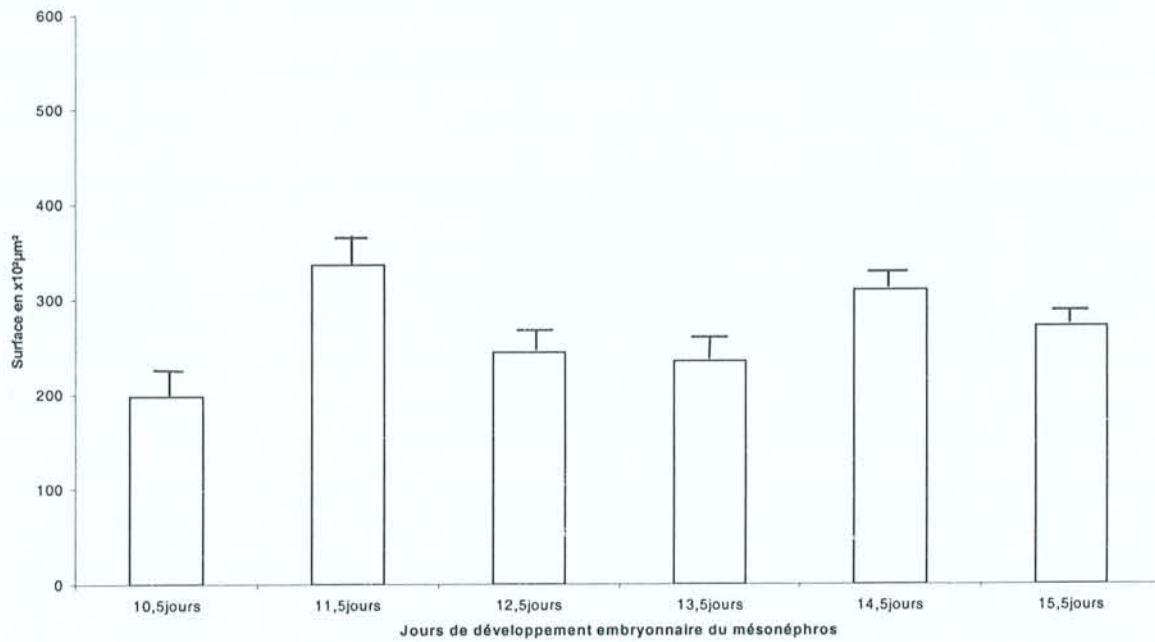
Evolution du volume des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle



b

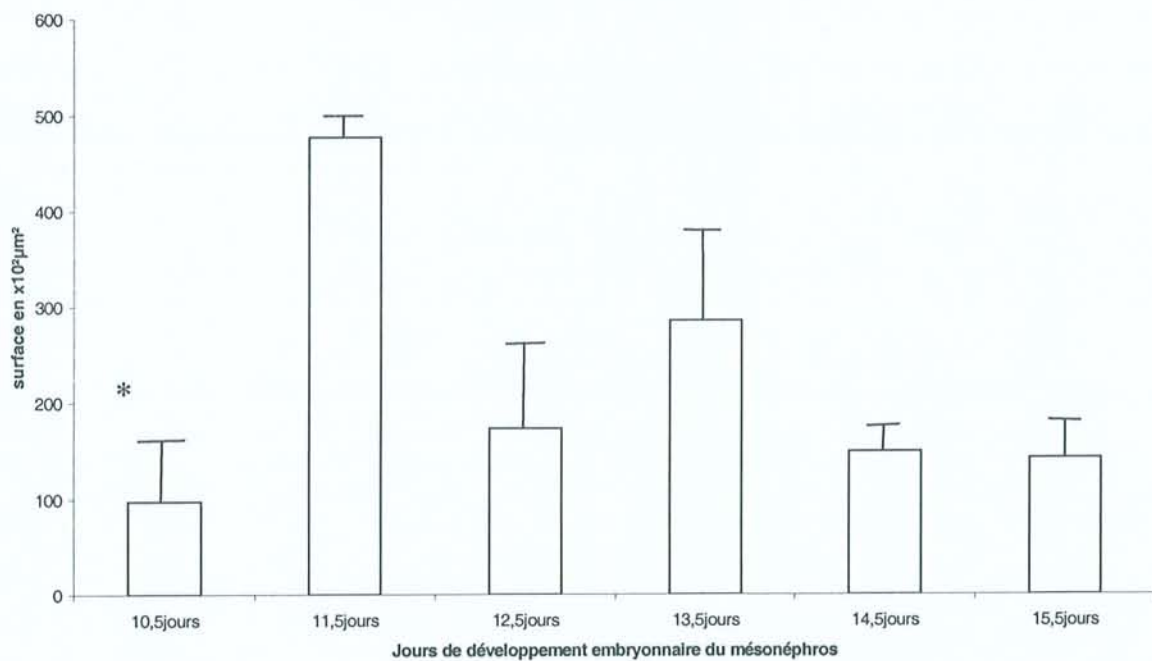
Figure 79 : Evolution du volume des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



a

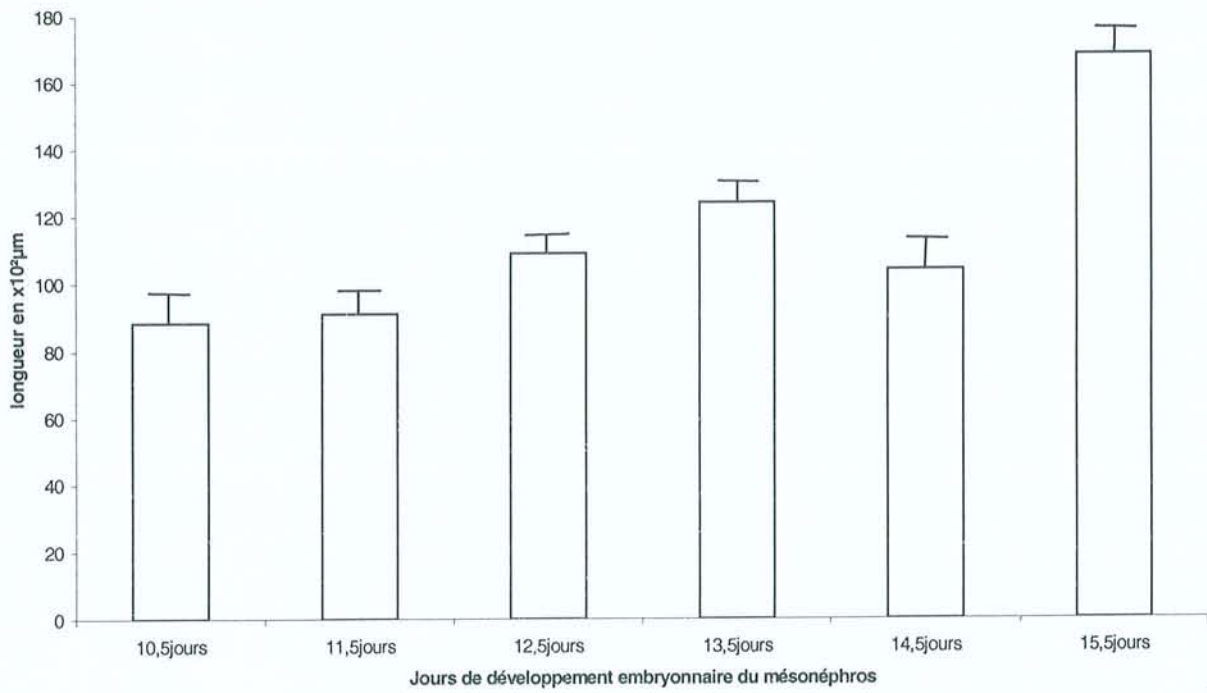
Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelles



b

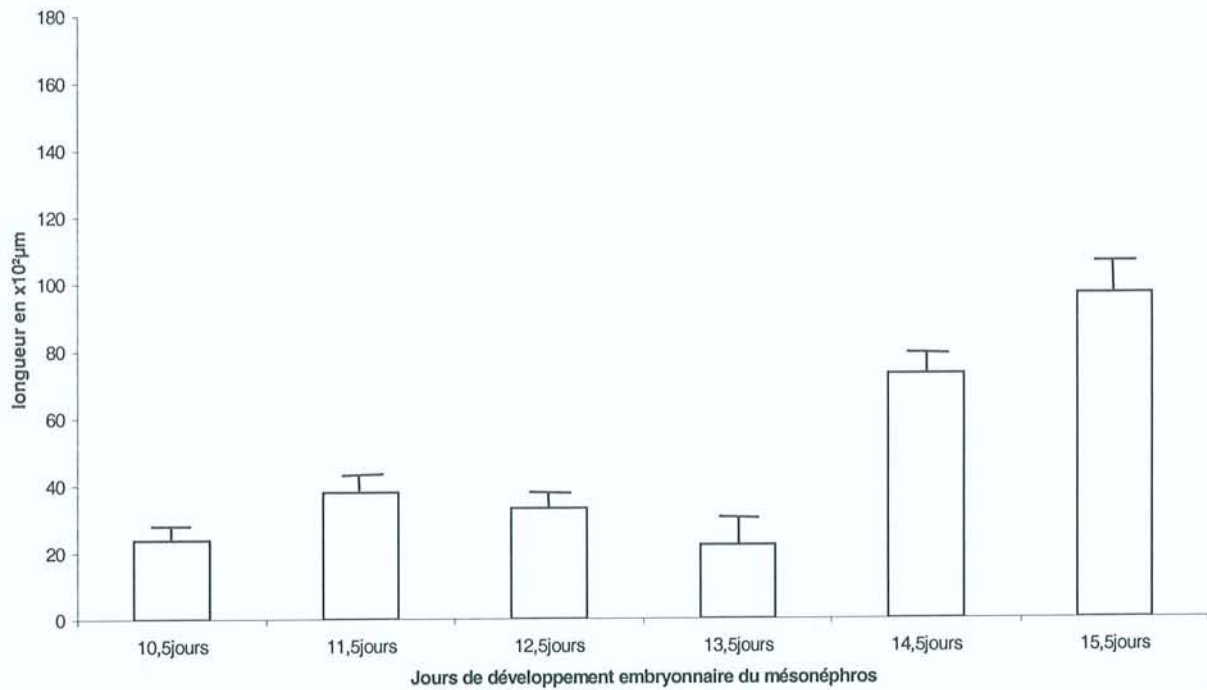
Figure 80 : Evolution de la surface des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



a

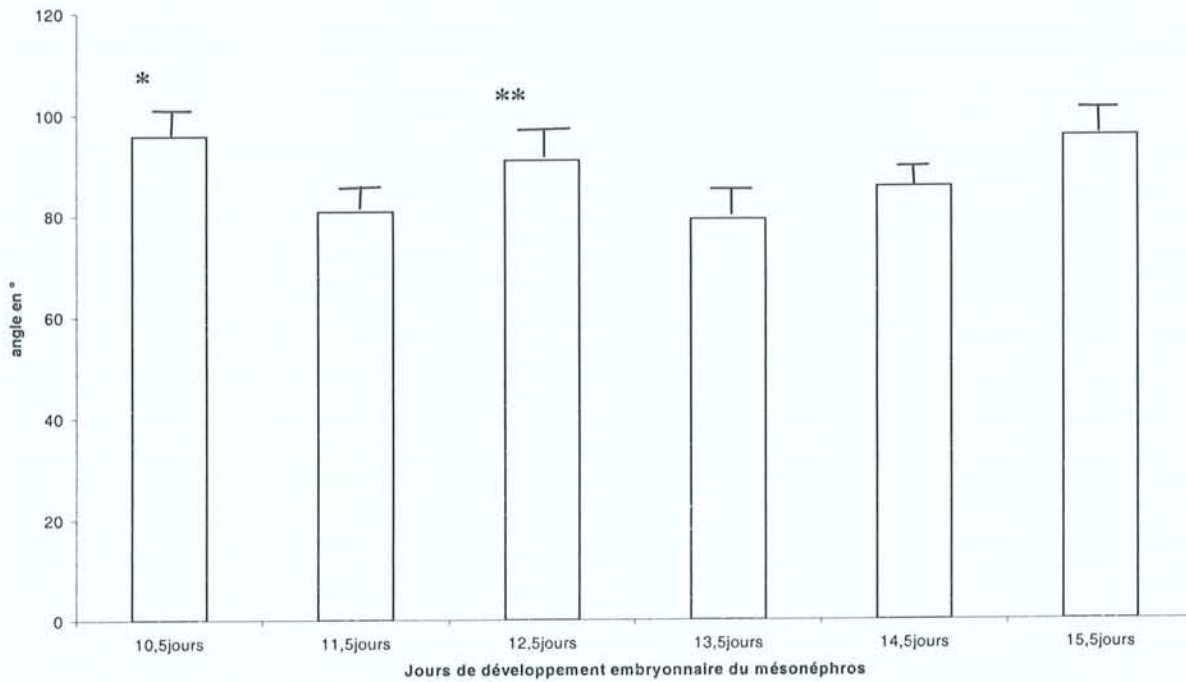
Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle



b

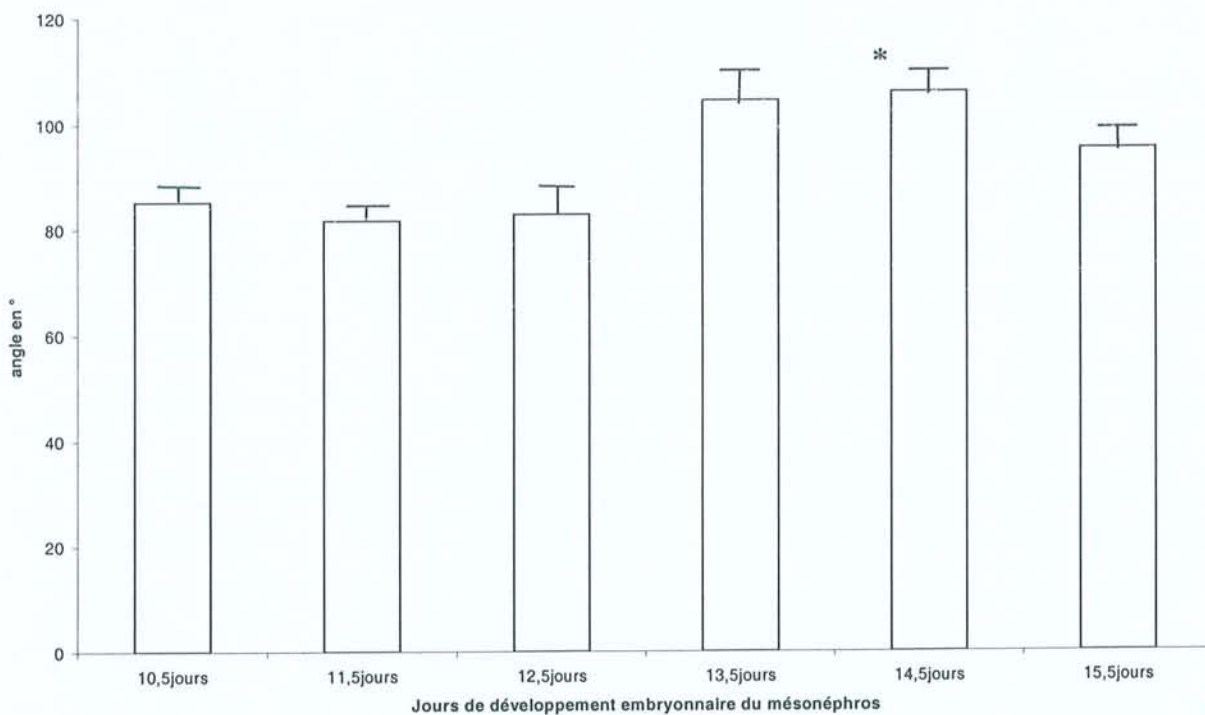
Figure 81 : Evolution de la longueur des tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques liés et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros mâle



a

Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques liés et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement du mésonéphros femelle



b

Figure 82 : Evolution de l'angle formé entre les tubules mésonéphritiques liés et le grand axe du canal de Wolff au cours du développement embryonnaire du mésonéphros mâle (a) et femelle (b).

Chez les femelles, les changements d'orientation des tubules non liés entre les 2 stades successifs sont plus modérés. Par contre, des différences entre les stades 10,5 et 11,5 jours sont notées. Le volume passe de $50 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ à $140 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (Figure 75b) et la surface de $60 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ à $700 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ (Figure 76b). Ces résultats sont en accord avec une croissance des tubes isolés. Pour les stades suivants, les différences sont moins nettes, mais s'expliquent par le fait qu'ils prennent ensuite la forme d'un S (11,5 et 12,5 jours; Figures 61 et 64), puis s'étalent (12,5 et 13,5 jours; Figures 64 et 67).

Pour les tubules liés :

Chez les mâles, le volume présente une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre les stades 10,5-11,5 et 11,5-12,5 jours. De plus, l'angle formé présente une différence significative ($p < 0.05$) entre les stades 10,5 et 11,5 jours et une différence hautement significative ($p < 0.01$) entre les stades 12,5 et 13,5 jours. Ces résultats sont en accord avec le passage de tubes droits émergents du corps de Wolff (Figure 56) à des tubules qui s'inclinent et prennent la forme de J puis de S (Figure 57). Entre 11,5 et 12,5 jours, les tubules contournés descendent en spirale et forment des boucles terminales (Figures 60 à 64).

Chez les femelles, la surface présente une différence significative ($p < 0.05$) entre les stades 10,5 et 11,5 jours, lors de la transition entre l'émergence des tubules à la formation de tubule contourné (Figures 58 et 62 ; Figure 80b). De plus, l'orientation change de manière significative ($p < 0.05$) entre 14,5 et 15,5 jours qui s'explique probablement par une transformation des tubules contournés en des tubes droits (Figures 74 et 82b).

3.2.4. Conclusion : Réflexions sur le développement du mésonéphros murin

La reconstruction des mésonéphros et son analyse apporte de nombreuses informations sur l'origine des tubules mésonéphritiques, sur leur mode de développement et d'organisation. Les reconstructions obtenues ont permis d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes possibles de développement du mésonéphros ainsi que de dégager un aspect différencié mâle-femelle.

3.2.4.1. Les origines des tubules mésonéphritiques

Dès 10,5 jours, il est possible d'observer de petits tubes droits qui se dégagent du corps de Wolff. Ces tubes s'allongent, puis s'inclinent en prenant la forme d'un J puis d'un S (Figures 56 à 58). La visualisation des mésonéphros, à 10,5 jours, permet de conclure que la formation des tubules mésonéphritiques se réalise par émergence du corps de Wolff et non par fusionnement de tubules isolés vers le canal de Wolff. Caudalement, des tubules isolés apparaissent sous forme de tubes droits, le long du canal de Wolff.

Ces premières remarques sont en accord avec les résultats des techniques histochimiques *in toto* obtenus à partir d'animaux homozygotes *wt1^{-/-}* (Sainio *et al*, 1997 [105]). Leurs travaux ont montré une absence de tubules caudaux isolés et une faible réduction du nombre des tubules rostraux liés au canal de Wolff par rapport à des animaux normaux. Leurs résultats suggèrent que l'origine des tubules liés diffère de celle des tubules isolés ; ces derniers auraient pour origine le mésenchyme mésonéphritique, et les tubules liés le corps de Wolff.

A 11,5 jours, les tubules isolés prennent la forme d'un J dans la portion la plus caudale du mésonéphros. Puis en se rapprochant des tubules liés rostraux, la partie axiale du J se courbe en S (Figures 60 à 62).

A 12,5 jours, le nombre de tubules isolés rostraux augmente considérablement (mésonéphros 9 ; Figure 65) et ils se répartissent dans la portion rostrale du canal de Wolff. Les travaux de Sainio (1997) [105] montrent que l'origine des tubules isolés caudaux diffère de celle des tubules liés. Leurs résultats n'apportent pas d'informations sur les tubules isolés rostraux car le stade le plus proche étudié est 11,5 jours.

Il est fort probable que les tubules isolés caudaux ont bien pour origine le mésenchyme mésonéphritique. Les mésonéphros 7 et 9 reconstruits (Figures 64 et 65) montrent que les tubules isolés rostraux proviennent des tubules mésonéphritiques voisins, liés au canal de Wolff. L'observation du mésonéphros 7, mâle, montre des tubules mésonéphritiques contournés à leur extrémité médiale, alors que le mésonéphros 9 appartenant à la même portée et de même sexe, présente des tubules liés réduits à des tubes droits et accompagnés de tubules isolés ressemblant à l'extrémité des tubules liés du mésonéphros 7 (Figure 83). Ces résultats permettent de suggérer une origine wolffienne des tubules isolés les plus rostraux. Par contre, aucun argument morphologique ne permet d'affirmer ou d'infirmer une origine mésenchymateuse des tubules isolés caudaux. Le mécanisme de développement de ces derniers semble similaire à celui des tubules liés. Par contre de 14,5 à 15,5 jours, les tubules isolés disparaissent.

Les tubules isolés caudaux sont absents dans les souris homozygotes *wl1^{-/-}* (Sainio *et al*, 1997 [105]) et les souris transgéniques homozygotes pour une mutation dans *wl1* présentent une absence de reins (Kreidberg *et al*, 1993 [55]). Ces observations permettent de suggérer une étape commune à la différenciation du mésonéphros caudal et du métanéphros. Par ailleurs, l'observation des coupes histologiques des mésonéphros mâles et femelles de 13,5 à 15,5 jours révèlent que les tubules isolés rostraux, provenant de la dégénérescence des tubules liés au canal de Wolff, participeraient, probablement, à la formation, des rete testis et ovari.

3.2.4.2. Mode de développement et d'organisation

Les tubules, qui se dégagent du corps de Wolff, se dirigent vers la gonade en suivant un mouvement spiralé et peuvent faire l'objet d'une bifurcation à leur point d'émergence. Au cours de leur progression, certains tubules vont fusionner entre eux, donnant à la portion rostrale du mésonéphros un aspect réticulé.

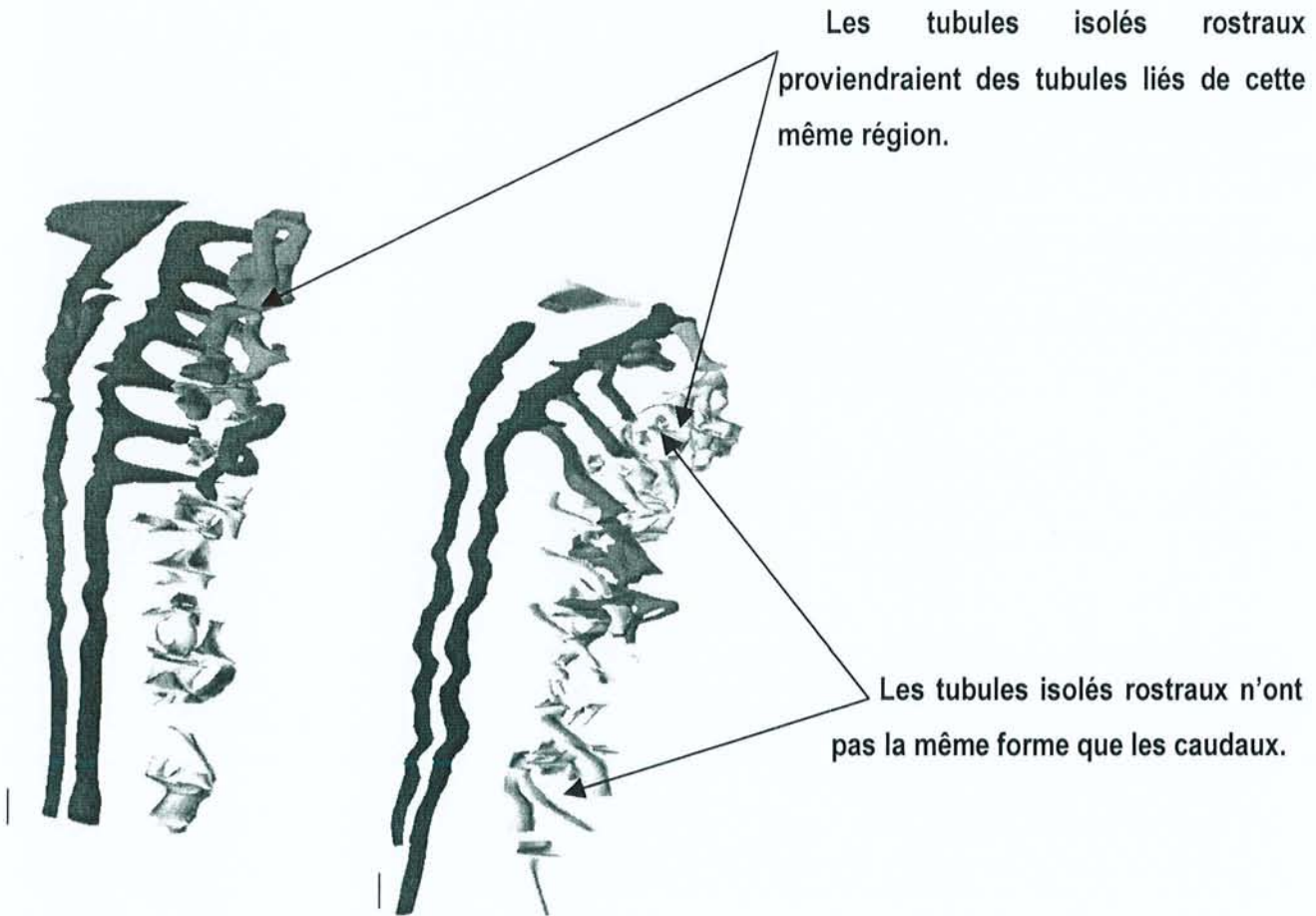


Figure 83 : Origine des tubules isolés rostraux à partir des mésonéphros 7 et 9 d'embryons mâles appartenant à une même portée de 12,5 jours.

3.2.4.2.1. La spirale : mode de développement des tubules mésonéphritiques

L'analyse des caractères morphologiques grâce à la reconstruction permet d'émettre, des hypothèses quant aux rôles de la spirale et aux mécanismes probables de sa formation.

3.2.4.2.1.1. Rôle de la spirale dans le développement du mésonéphros

Dans le développement des tubules mésonéphritiques, l'intérêt d'un tel enroulement en spirale de 11,5 à 12,5 jours serait de permettre l'échange de molécules avec le milieu environnant ou le transport d'éléments ou de cellules. Or, le mésonéphros murin est dit vestigial et non fonctionnel. L'usage d'un tel mode d'enroulement par les cellules mésonéphritiques, qui participent à la formation des tubules mésonéphritiques, s'explique probablement par les faits suivants :

- la spirale permet d'obtenir un tubule très long sur une courte distance dans l'axe médio-latéral,
- la spirale permet la progression du tubule malgré l'existence éventuelle de contraintes limitantes de l'espace environnant,
- la spirale facilite les échanges cellulaires avec une zone de l'environnement favorable et restreint.

Par ailleurs, le positionnement des différents tubules serait lié à l'existence de l'axe rostro-caudal des embryons. En effet, une concentration rostrale des tubules qui participent à la formation du rete est facilement observable alors que les tubules isolés, provenant du mésenchyme mésonéphritique, se localisent essentiellement dans la portion caudale du mésonéphros. A cette première polarité, s'ajoute une autre orientation fondamentale, celle de l'organisation dorso-ventrale. Il s'agit du sens de l'enroulement des tubules qui se dirigent vers la portion rostrale de la gonade, mais aussi de la forme de certains tubules isolés. La polarité dorso-ventrale est déterminée par une cascade d'évènements génétiques largement indépendants de ceux qui assurent la mise en place de l'axe rostro-caudal après la gastrulation. Il est donc possible que les

tubules isolés et ceux qui sont liés au canal de Wolff puissent présenter un même mouvement spiralé sans provenir de la même souche de cellules.

3.2.4.2.1.2. Mécanisme de formation du tubule spiralé

Ce mouvement, en spirale, serait basé sur le nombre et la localisation des mitoses au niveau du cône cellulaire ; cône qui participerait à la formation du futur tubule. Si les divisions sont plus nombreuses dans les cellules rostrales que dans les cellules caudales du tubule, alors le cône cellulaire aura tendance à se courber vers l'extrémité caudale (Figure 84). Inversement, si les divisions sont plus nombreuses dans les cellules rostrales du tubule, alors le cône aura tendance à se courber vers l'extrémité rostrale. Non seulement les cellules de la zone « apicale » de croissance pourraient participer à la mise en place des divisions cellulaires, mais aussi être caractérisées par une réduction relative de la largeur du pôle apical de ces cellules. Ces 2 phénomènes seraient à l'origine d'une rotation rostogyre ou caudogyre des spirales (Figure 85). Il est fort probable que les cellules constitutives du tubule présente une dissymétrie cellulaire comme dans la gastrulation ou la formation du tube neural.

3.2.4.2.2. La bifurcation : mode de développement et d'organisation des tubules mésonéphritiques

L'observation des mésonéphros reconstruits et des coupes histologiques étudiés apportent des informations sur l'intérêt et le mécanisme d'apparition de la bifurcation.

3.2.4.2.2.1. Rôle de la bifurcation

Au niveau d'une bifurcation, la branche la plus rostrale peut être rostogyre ou caudogyre et la branche la plus caudale est toujours caudogyre.

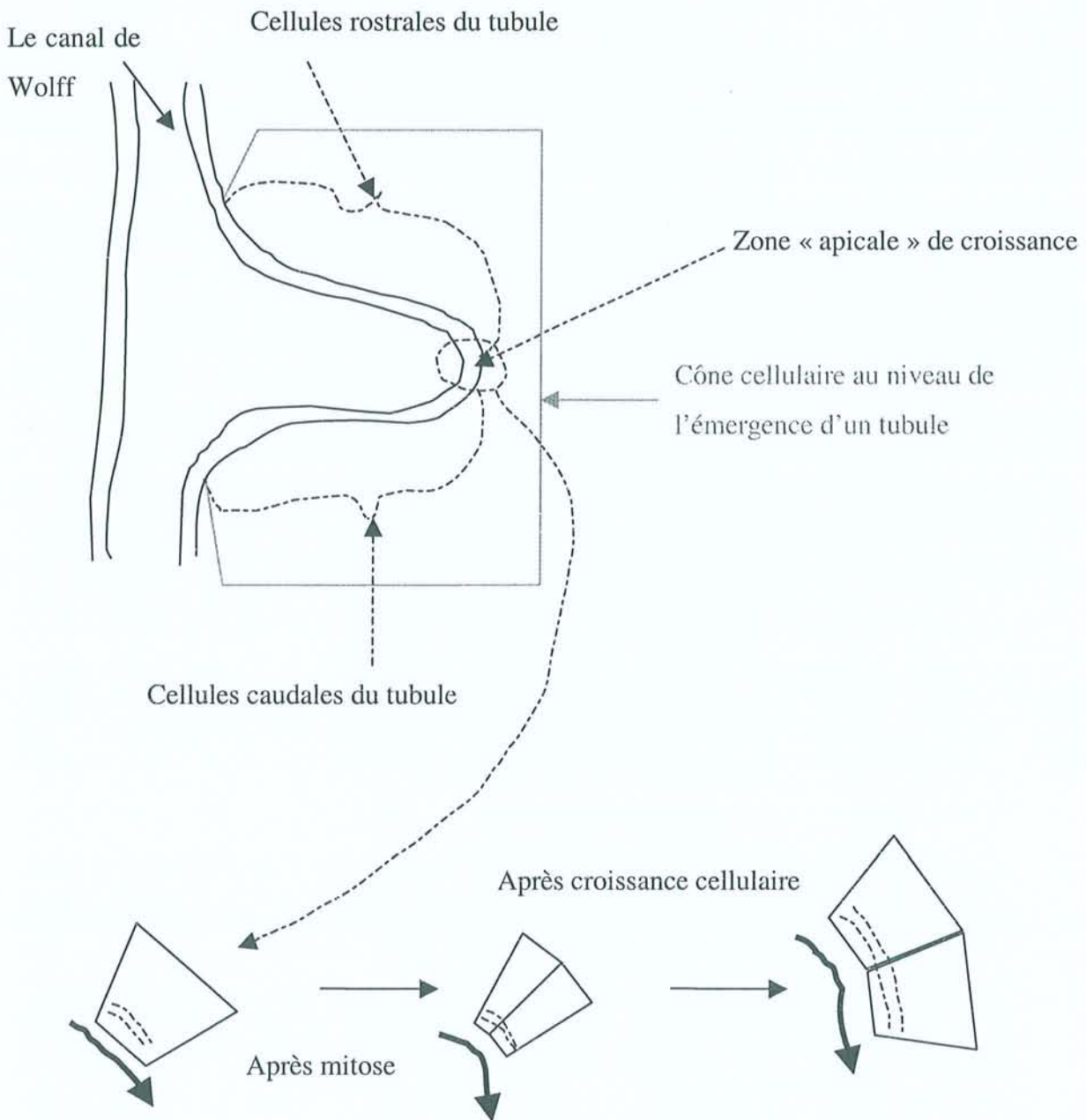


Figure 84 : Schématisation hypothétique d'un mécanisme d'apparition du tubule spiralé par un grand nombre de mitoses.

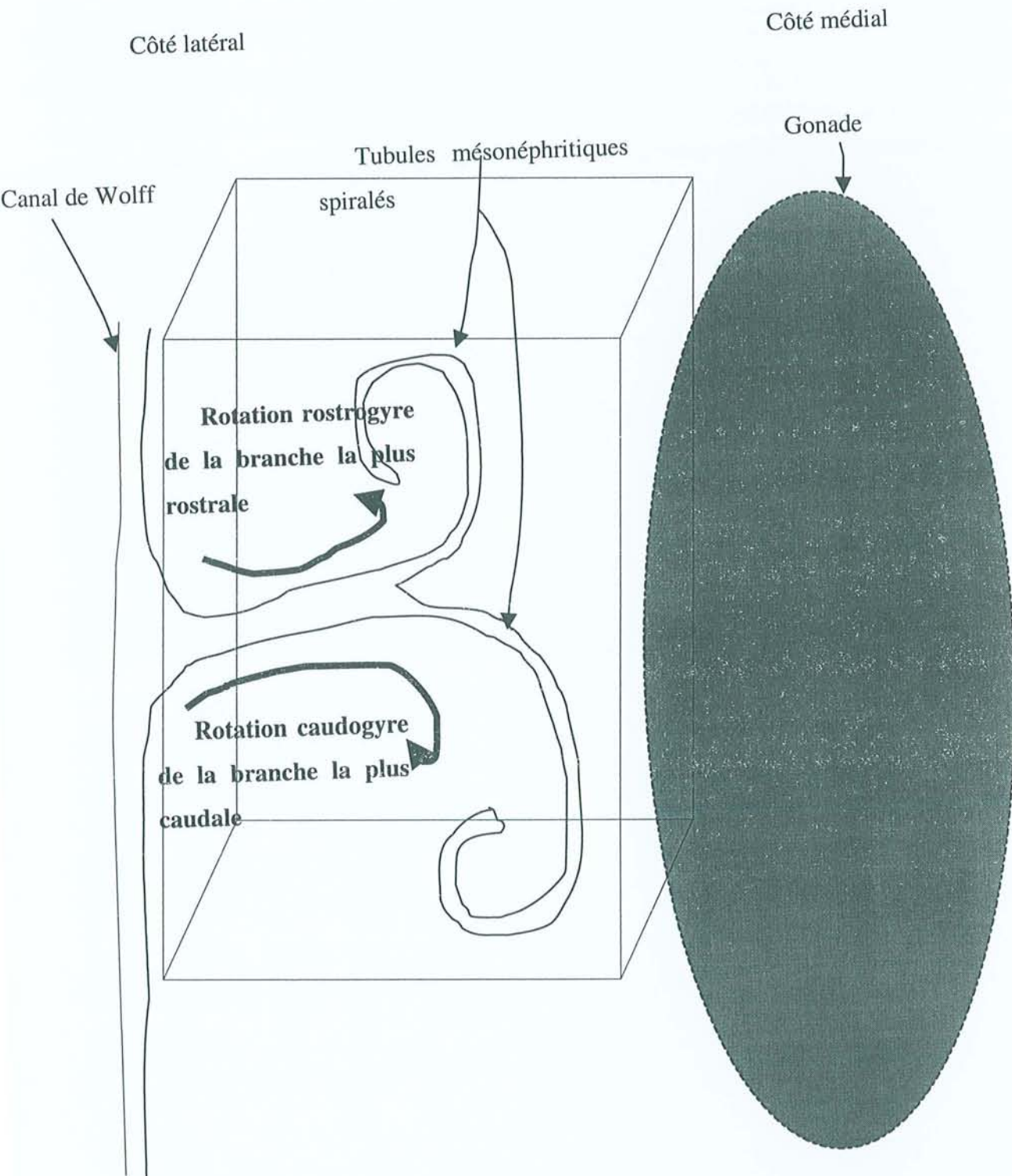


Figure 85 : Représentation des rotations rostrogyre et caudogyre à la suite d'une bifurcation.

Le rôle probable des bifurcations serait d'obtenir un plus grand nombre de tubules spiralés au sein d'une zone limitée du mésenchyme mésonéphritique et de recouvrir au maximum une zone médiale.

A la suite d'une bifurcation, la branche la plus rostrale peut présenter une rotation rostrogryre qui permettrait au tubule de se connecter avec un tubule spiralé plus rostral et d'établir une structure réticulée, caractérisant le mésonéphros femelle (Figures 88 et 90).

Dans les mésonéphros mâles, les bifurcations permettent de séparer les tubules les uns des autres (Figures 89 et 91).

Après l'émergence du tubule à partir du corps de Wolff, la bifurcation représente un mode initial de séparation des tubules.

3.2.4.2.2.2. Mécanisme de formation de la bifurcation

Les tubules mésonéphritiques, liés au canal de Wolff, forment des spirales caudogyres. Les rares tubules qui forment des spirales rostrogryres, apparaissent à la suite d'une bifurcation. Celle-ci peut s'expliquer par 2 mécanismes :

Le premier mécanisme se produirait par l'intermédiaire d'une zone « apicale » de croissance située à l'extrémité du cône cellulaire (Figure 84). Celle-ci contiendrait des cellules en apoptose. Cette zone séparerait les cellules rostrales des cellules caudales. De cette zone, une bifurcation serait à l'origine de 2 tubules spiralés.

Le second mécanisme ferait intervenir un certain nombre de cellules dont une cellule obstacle médiane, au niveau de la zone « apicale » de croissance (Figure 86). Cette cellule ferait obstacle par son activité mitotique par exemple. Ce fait a été observé sur certaines coupes histologiques qui révèlent des sites d'activité mitotique au niveau de certaines bifurcations. Ce résultat n'est pas observable au niveau de chaque bifurcation.

Par ailleurs, à la suite d'une bifurcation, le tubule le plus rostral peut présenter un enroulement rostrogyre. Ce phénomène apparaît toujours dans la portion la plus caudale du mésonéphros.

Il est probable que les cellules situées au niveau de la zone de bifurcation, présentent des propriétés différentes suivant leur localisation. Le pôle le plus rostral du tubule serait constitué de cellules à l'origine d'un enroulement rostrogyre du tubule, inversement les cellules du pôle le plus caudal du tubule seraient à l'origine d'un enroulement caudogyre du tubule (Figure 87).

De plus, l'enroulement rostrogyre des tubules étant très rare, il est possible que la quantité de cellules à l'origine d'un tel enroulement soit relative à la localisation de la bifurcation au niveau du canal de Wolff. Plus la bifurcation se situerait rostralement par rapport au canal de Wolff, plus la quantité de cellules pouvant contribuer à un enroulement rostrogyre serait faible. Inversement, plus la bifurcation se situerait caudalement, plus la quantité de cellules à l'origine d'un enroulement rostrogyre du tubule augmenterait et permettrait l'apparition d'un tubule rostrogyre.

A partir d'un tubule émergeant dans la portion la plus caudale du canal de Wolff, il peut se produire 3 types de bifurcations :

Si la bifurcation apparaît dans le 1/3 rostral du tubule émergeant, alors le tubule le plus rostral sera rostrogyre du fait de l'absence de cellules du pôle caudal et le tubule le plus caudal sera caudogyre.

Pour les mêmes raisons, si la bifurcation se produit exactement à la limite entre les 2 frontières, le tubule le plus rostral présentera un enroulement rostrogyre.

Si la bifurcation apparaît dans le 1/3 caudal du tubule émergeant, alors les 2 tubules contenant chacun des cellules du pôle caudal présenteront un enroulement caudogyre.

C'est donc la localisation du tubule émergeant et le niveau de la bifurcation qui vont conditionner l'apparition d'une branche avec un enroulement rostrogyre.

L'apparition de tubules caudogyres tout le long du mésonéphros et d'un à deux tubules rostrogyres dans la portion caudale du mésonéphros est probablement liée à une segmentation de l'extrémité rostrale du canal de Wolff.

Le canal de Wolff

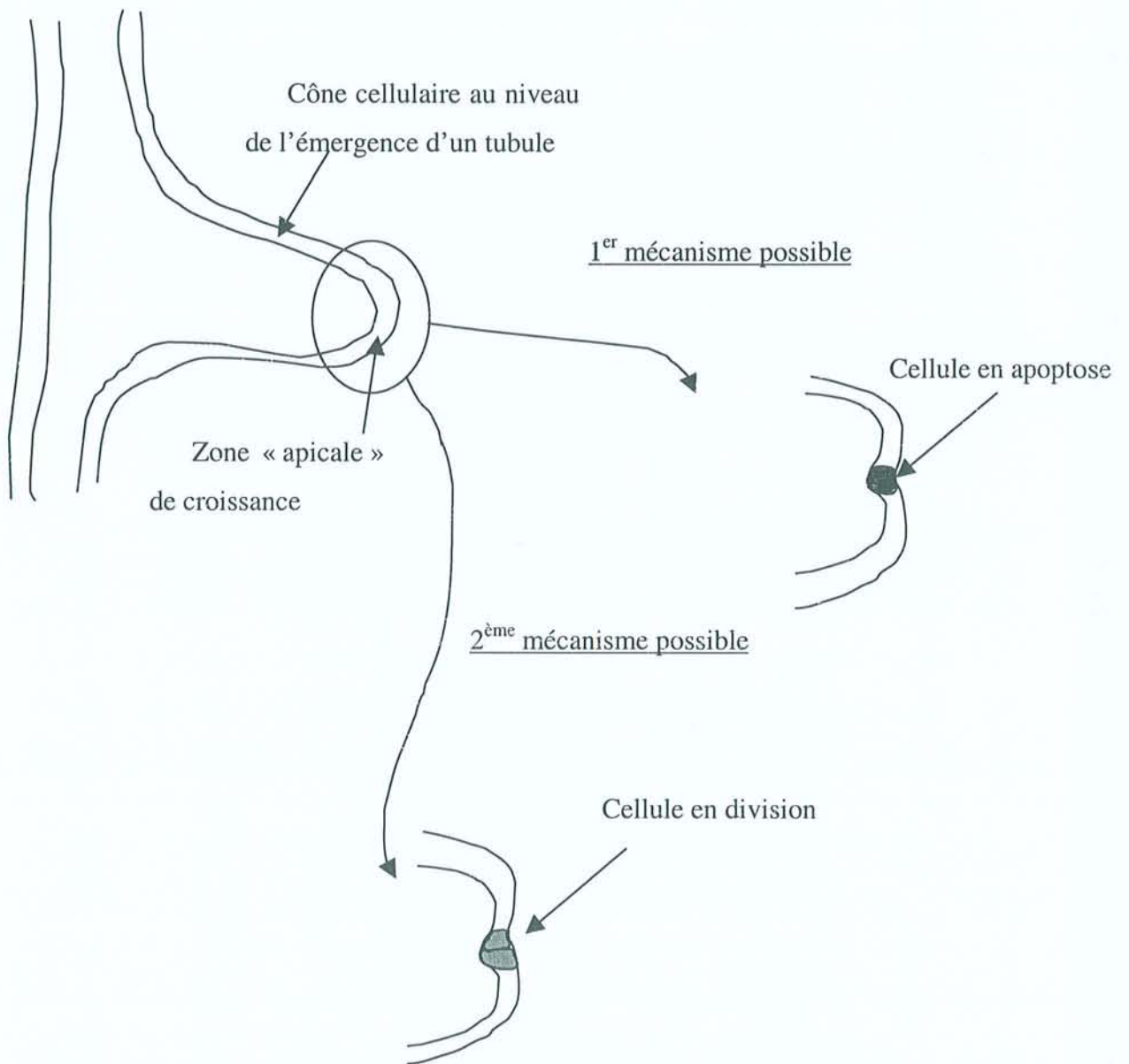
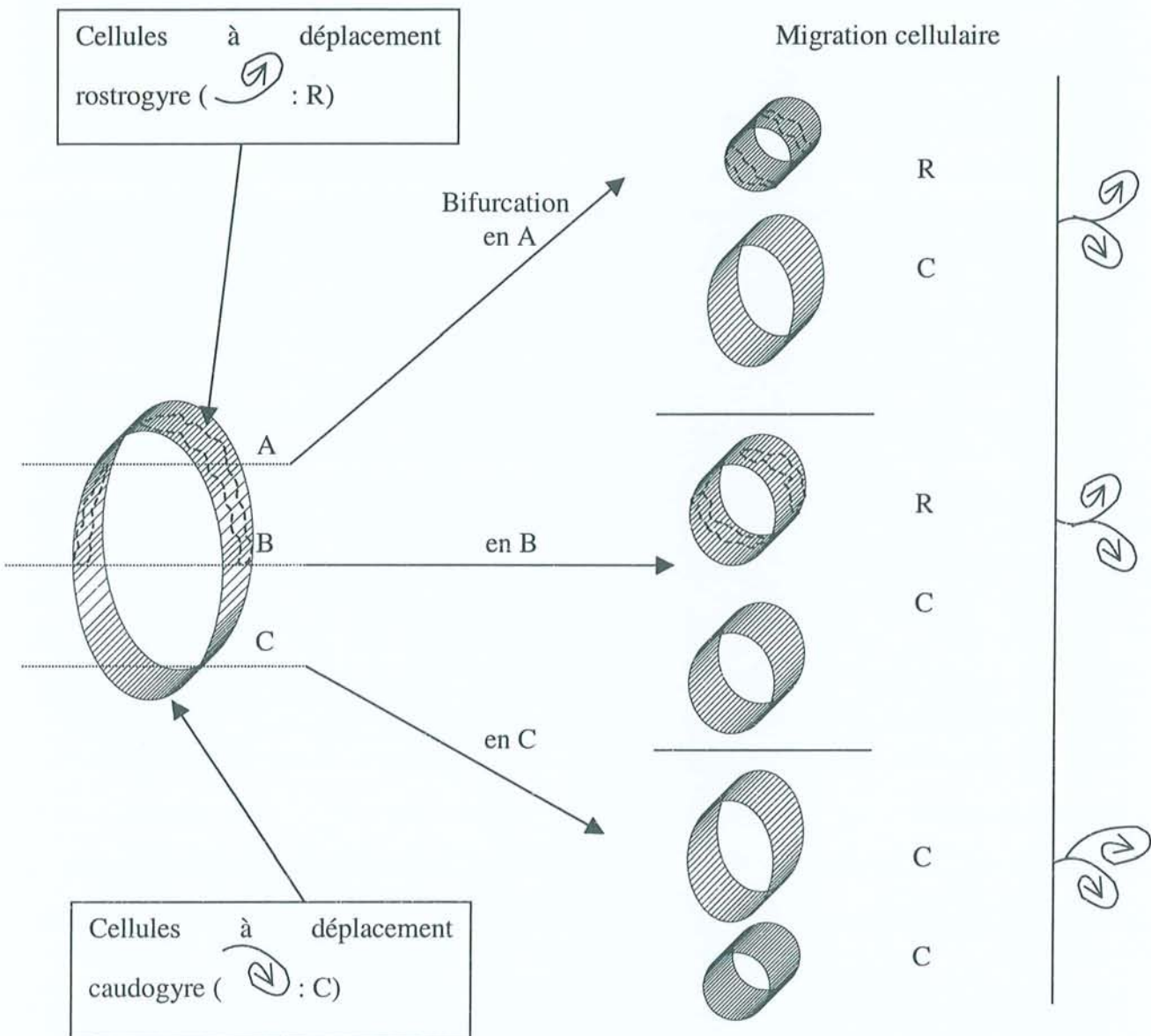


Figure 86 : Schématisation hypothétique du 1^{er} et 2^{ème} mécanisme d'apparition d'une branche rostrogyre ou caudogyre à la suite d'une bifurcation.



A partir d'un tubule émergeant dans la portion la plus caudale du canal de Wolff, il peut se produire 3 types de bifurcations (en A, B et C).

Si la bifurcation apparaît dans le 1/3 rostral du tubule émergeant (en A), alors le tubule le plus rostral sera rostrogyre du fait de l'absence de cellules du pôle caudal et le tubule le plus caudal sera caudogyre.

Pour les mêmes raisons, si la bifurcation se produit exactement à la limite entre les 2 frontières (en B), le tubule le plus rostral présentera un enroulement rostrogyre.

Si la bifurcation apparaît dans le 1/3 caudal du tubule émergeant (en C), alors les 2 tubules contenant chacun des cellules du pôle caudal présenteront un enroulement caudogyre.

Figure 87 : Hypothèse de la formation d'une spirale rostrogyre suite à une bifurcation.

3.2.4.2.3. La structure réticulée : mode de développement et d'organisation des tubules mésonéphritiques

Les mésonéphros reconstruits d'embryons femelles permettent d'émettre des hypothèses sur l'intérêt d'une structure réticulée et apportent des informations sur sa mise en place et sur ce qui distingue les mésonéphros mâles des mésonéphros femelles.

3.2.4.2.3.1. Rôle de la structure réticulée

Ce type de structure se rencontre uniquement au niveau de la portion rostrale des mésonéphros d'embryons femelles de 11,5 à 13,5 jours. Ensuite, il ne reste que des vestiges (mésonéphros 11, Figure 74). Cette organisation des tubules semble promouvoir l'apparition du futur rete ovarii. L'intérêt d'une telle structure serait de faciliter soit la distribution ou le retour d'une substance quelconque, soit la communication d'une zone à l'autre, ou encore de conférer une certaine amplitude de mouvement entre le canal de Wolff et la gonade.

3.2.4.2.3.2. Mécanisme de formation d'une structure réticulée

La formation d'une telle structure se baserait sur l'apparition, en parallèle, de plusieurs bifurcations qui se raccorderaient entre elles.

Par exemple, à 11,5 jours, de 4 points d'émergence du canal de Wolff se dégagent 4 bifurcations. Cette première étape est la même quelque soit le sexe de l'embryon (Figures 88 et 89). C'est dans une seconde étape que la structure réticulée permettra de distinguer le mésonéphros d'embryon femelle du mésonéphros d'embryon mâle.

Dans le mésonéphros 11 de la Figure 62, les connexions entre les tubules des bifurcations voisines se réalisent de la façon suivante :

- Les branches les plus rostrales des 2 dernières bifurcations sont rostrogynes et permettent de se connecter avec soit la branche la plus rostrale, soit la branche la plus caudale de la bifurcation qui la précède.
- Le nœud central de la connexion paraît se faire au niveau de l'extrémité de la branche la plus rostrale de la 2^{ème} bifurcation.

Un autre exemple, à 13,5 jours, montre à partir de 3 points d'émergence du canal de Wolff, 3 bifurcations dans le mésonéphros d'embryon femelle et 2 bifurcations initiales dans le mésonéphros d'embryon mâle (Figures 90 et 91). A ce stade de développement, la première étape conserve ses caractéristiques d'origine quelque soit le sexe. Par contre, la structure réticulée apparaît uniquement au niveau du mésonéphros d'embryon femelle. Comme dans l'exemple précédent, il se dégage 2 traits majeurs :

- La branche la plus rostrale de la 3^{ème} bifurcation, dont la rotation est rostrogre, se connecte à la branche la plus rostrale de la 2^{ème} bifurcation.
- Le nœud central de la connexion paraît se faire au niveau de la branche la plus rostrale de la 2^{ème} bifurcation.

L'examen de ces 4 mésonéphros montrent que l'enroulement rostrogre est moins fréquent que l'enroulement caudogyre. Cette orientation rostrogre ne correspond pas à une erreur d'enroulement des tubules, puisque cet enroulement rostrogre se produit toujours au niveau de la bifurcation la plus caudale. Bien au contraire, cet enroulement rostrogre d'un tubule mésonéphritique favorise la création de connexions entre les tubules participant à la formation de la structure réticulée.

D'autre part, il semble se dégager un gradient de complexité pour l'apparition de bifurcations et de connexions dans le sens rostro-caudal :

- Les bifurcations seraient plus nombreuses et plus rapprochées rostralement que caudalement.
- Les connexions seraient davantage consolidées entre la 1^{ère} et la 2^{ème} bifurcations qu'entre les suivantes.

Cette complexité est probablement le résultat de caractéristiques propres de certaines cellules de la zone « apicale » de croissance.

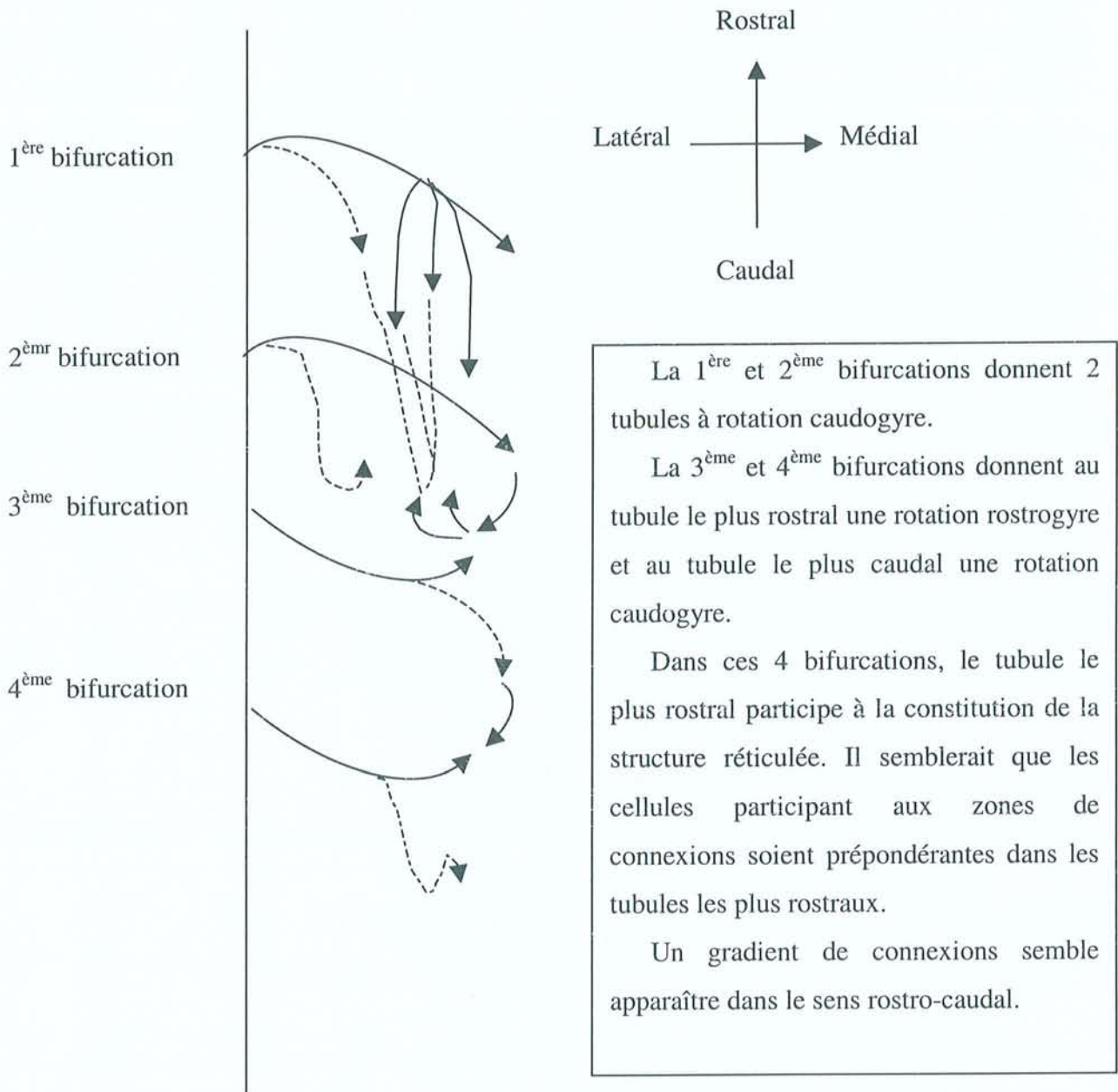


Figure 88 : Proposition de formation d'une structure réticulée à partir de 4 bifurcations dans un mésonéphros d'embryon femelle de 11,5 jours (mésonéphros 11 ; Figure 62).

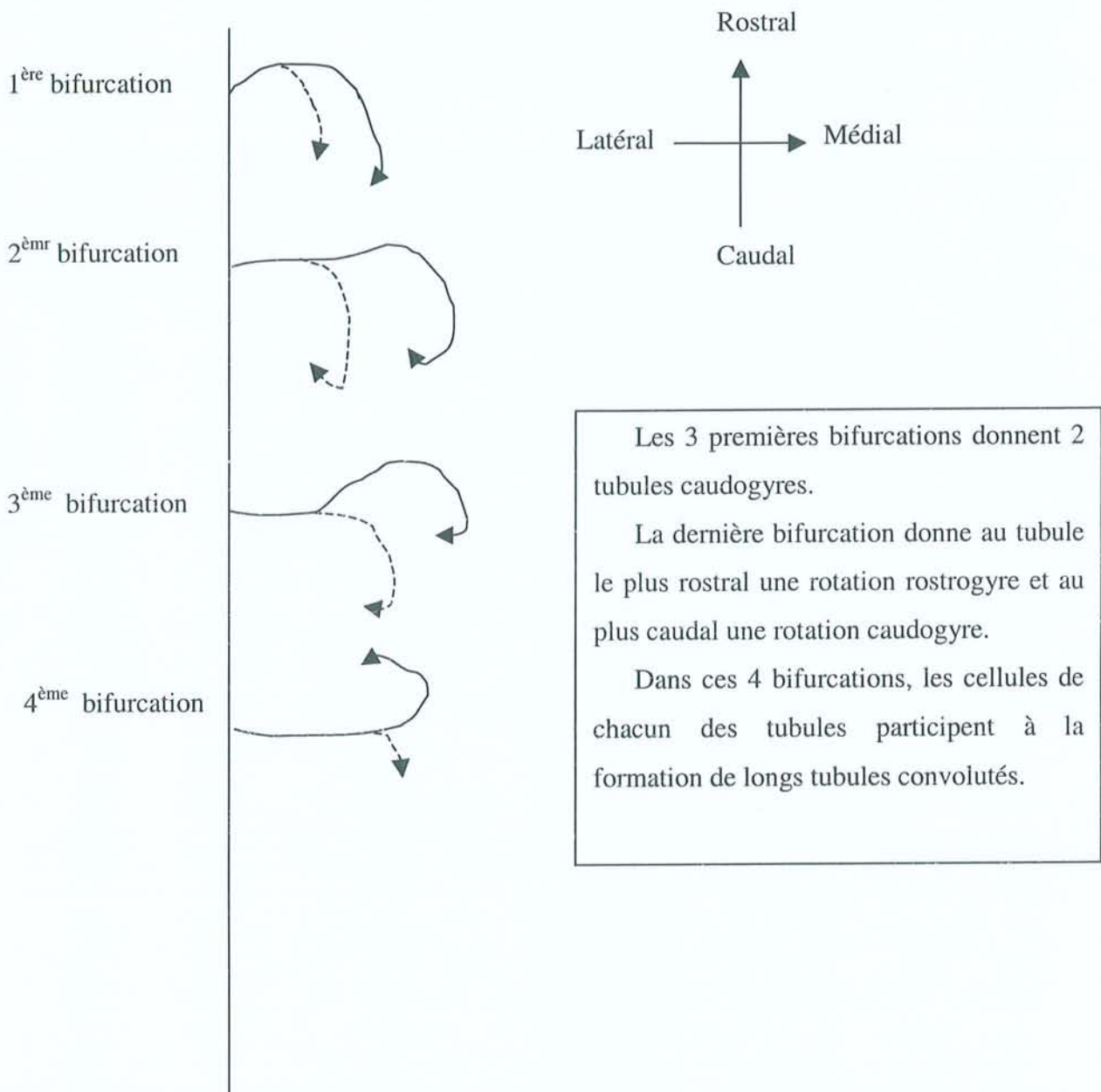


Figure 89 : Arrangement des tubules dans un mésonéphros d'embryon mâle de 11,5 jours, où 4 bifurcations se dégagent du canal de Wolff (mésonéphros 3 ; Figure 60).

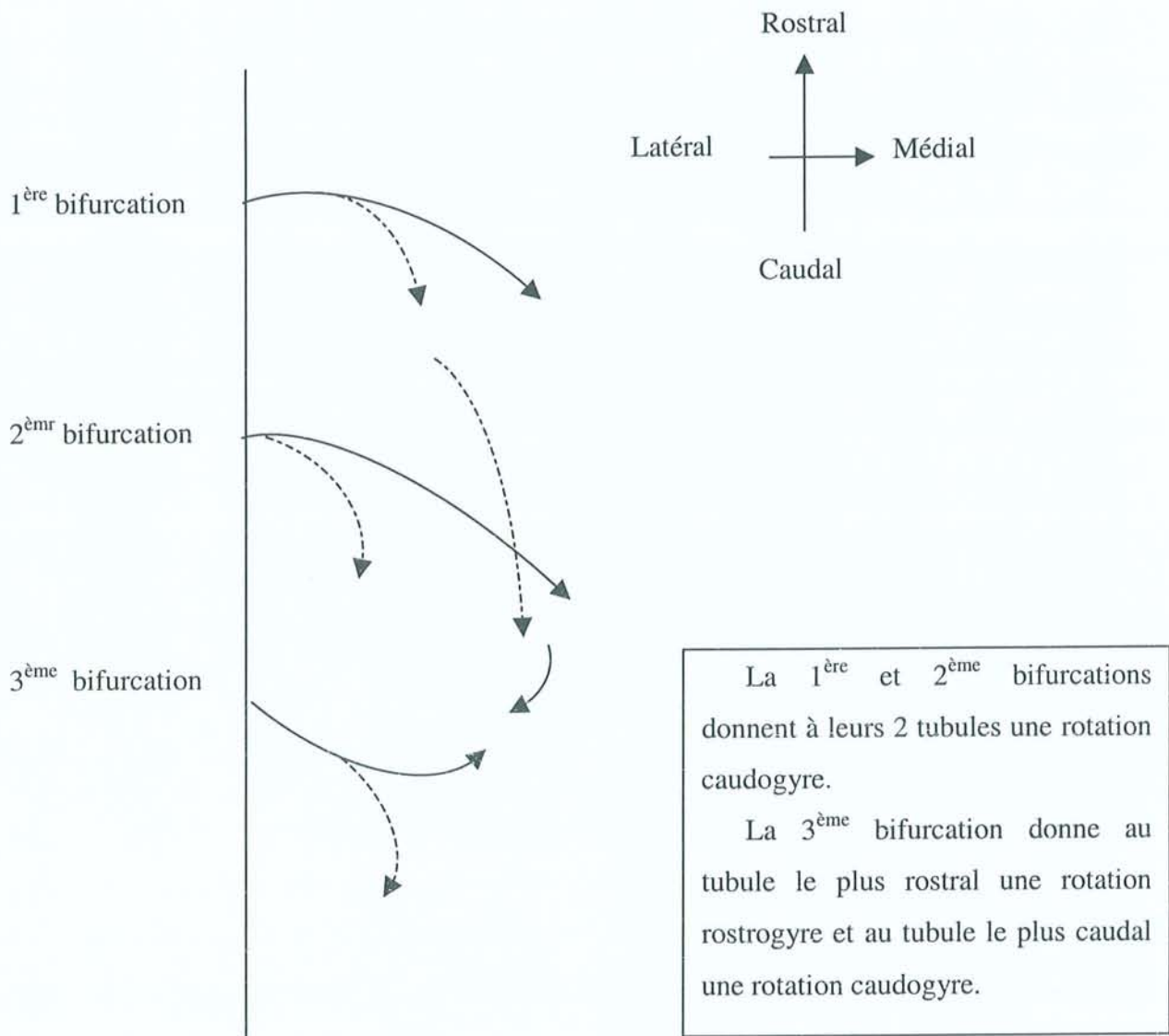


Figure 90 : Proposition de formation d'une structure réticulée à partir de 3 bifurcations dans un mésonéphros d'embryon femelle de 13,5 jours (mésonéphros 11 ; Figure 68).

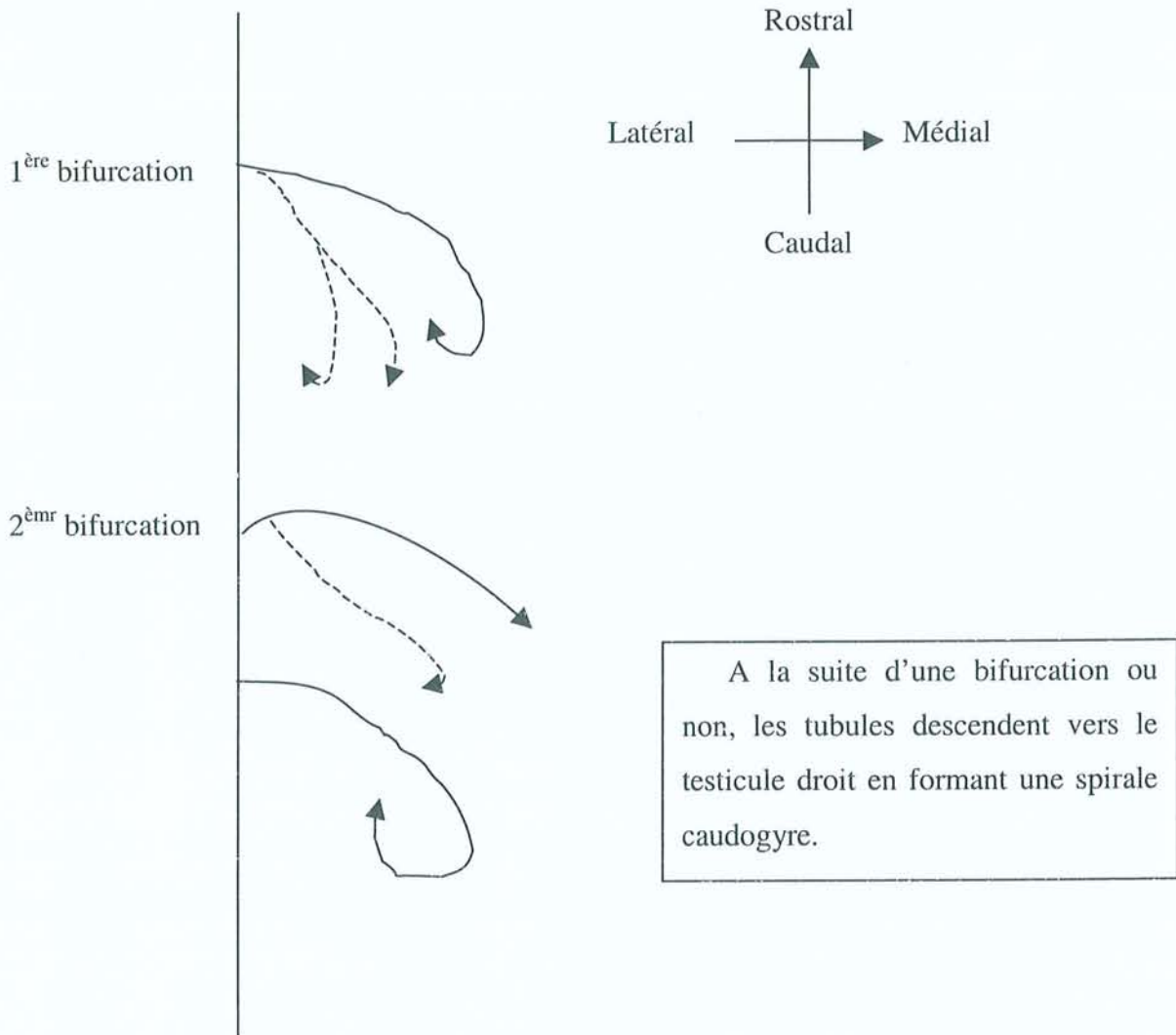


Figure 91 : Arrangement des tubules dans un mésonéphros d'un embryon mâle où seules 3 bifurcations émergentes du canal de Wolff persistent à 13,5 jours (mésonéphros 1 ; Figure 66).

Une chronologie de réticulation est probable car la structure réticulée s'observe chez les mésonéphros d'embryons femelles de 11,5 à 13,5 jours. Cette réticulation paraît se maintenir puisque le tubule *ld* du mésonéphros 11 d'embryon femelle de 15,5 jours présente une forme réticulée. Pour les embryons mâles, la structure réticulée apparaît plus tardivement dans les mésonéphros 4 et 8 de 14,5 jours et dans les mésonéphros 3 et 5 de 15,5 jours. L'apparition de la structure réticulée est probablement plus précoce dans les mésonéphros d'embryons femelles que dans les mésonéphros d'embryons mâles.

3.2.4.3. Contribution des tubules mésonéphritiques dans la formation du rete

Les observations de J. Bovy (1929) [8], ne signale l'existence d'aucun nephrostome, ou structure glomérulaire. Or, F. Brambell (1928) [9] en observe quelques-uns dès 11,5 jours, ils participeraient à la formation des jonctions cônes efférents-tubes droits du rete testis. L'observation des coupes histologiques a permis de visualiser une structure ressemblant à un nephrostome localisé au niveau de l'extrémité médiale d'un tubule mésonéphritique d'un mésonéphros d'un embryon femelle de 11,5 jours et situé au niveau du hile ovarien.

3.2.4.4.1. Le mésonéphros mâle

Lors de la formation du rete testis, 2 phénomènes se produisent :

- un élargissement de la partie tubulaire connectée au canal de Wolff, qui repousserait la boucle spiralée à l'extrémité médiale du tubule.
- une apparition d'anastomoses au niveau des extrémités latérales des tubules mésonéphritiques.

Ces 2 phénomènes permettent de proposer une contribution du mésonéphros dans la constitution des connexions cônes efférents-tubes droits à l'origine du rete testis (Figure 92).

3.2.4.4.2. Le mésonéphros femelle

L'apparition d'un rete ovarii rudimentaire se produit par des signes de régression sur le canal de Wolff même, ou à l'endroit de l'émergence du tubule. Les localisations des points de régression suggèrent que les cellules utiliseraient un mode d'action ciblée (Figure 93).

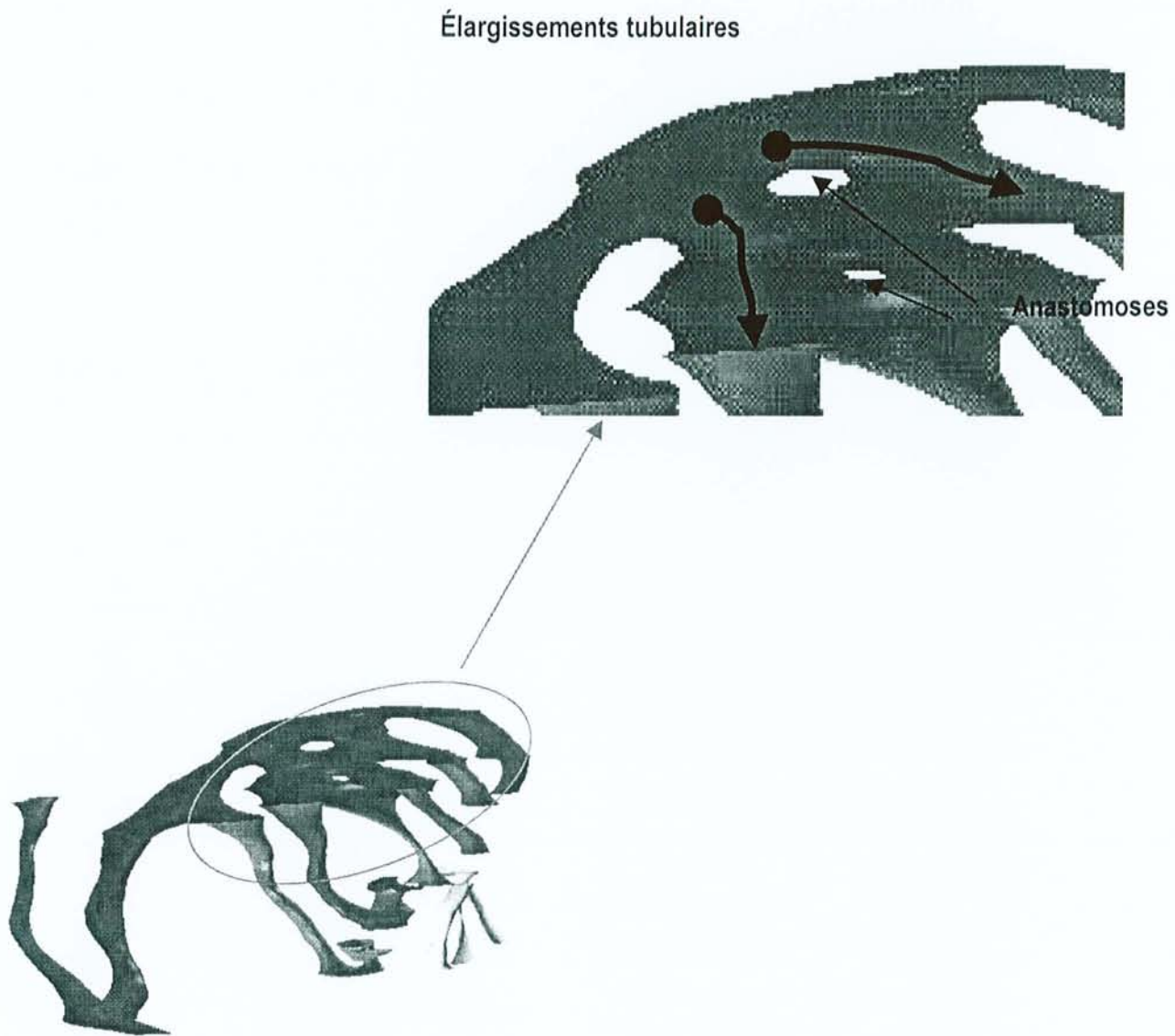


Figure 92 : Mécanisme de formation du rete testis sur un mésonéphros d'un embryon mâle de 15,5 jours.

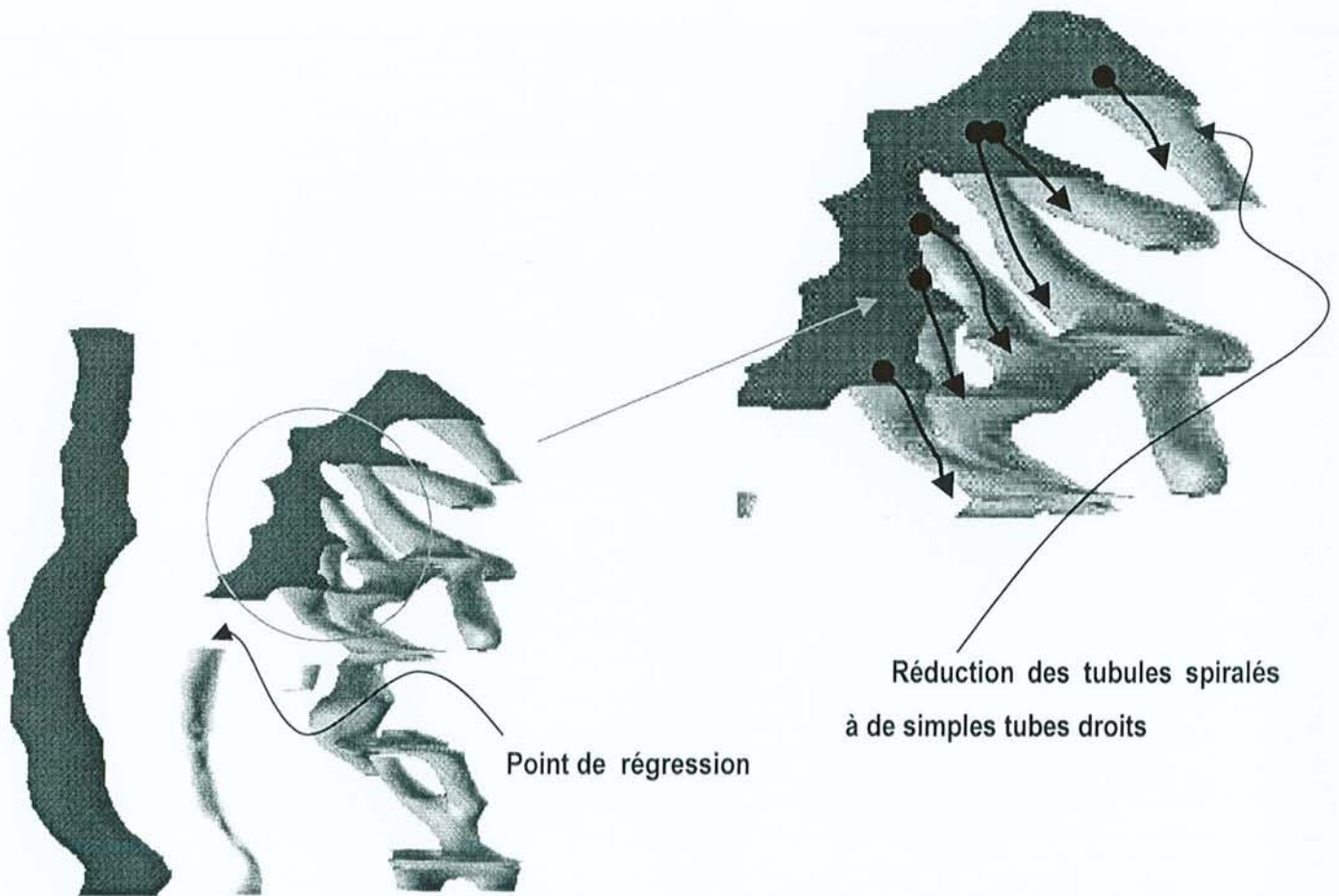


Figure 93 : Mécanisme de formation du rete ovarii dans un mésonéphros d'un embryon femelle de 15,5 jours.

4. DISCUSSION

4.1. Les apports et les limites de la méthodologie

L'histologie a permis d'assurer des prélèvements tissulaires adaptés aux moyens informatiques employés. Les avantages sont la sérialité, la conservation des coupes et la reproductibilité. Les inconvénients sont les limites dans l'épaisseur des coupes et le passage obligatoire par la chambre claire.

L'outil informatique utilisé menant à la conception de reconstruction 3D a permis de parvenir à la réalisation d'un ensemble des mésonéphros. Ces reconstructions de la région mésonéphritique au cours de son développement facilitent la compréhension des modes de formation des tubules mésonéphritiques. Par ailleurs, l'utilisation du programme de reconstruction gOcad offre des ouvertures multiples. Par exemple, une prise de données numériques sur les caractéristiques morphologiques de l'objet reconstruit peut conduire à une analyse quantitative ainsi qu'à la réalisation d'un modèle plastique par stéréophotolithographie laser. Une telle reconstruction a déjà été réalisée pour une mâchoire édentée (Molé, 1996 [78]). Il s'agit d'une pièce en acrylate qui améliore la perception de l'objet. De plus, ce logiciel permet de réaliser des séquences animées, mobilisables à souhaits facilitant la découverte par chacun de l'objet reconstruit. Des séquences animées ont été archivées sur CD. Elles peuvent être visualisées grâce à QuickTime VR et certaines par JPEG Views (voir CD en annexe).

4.1.1. Dans le mésonéphros d'embryon humain

Les reconstructions réalisées sur les mésonéphros humains offrent un dénombrement exact des divers tubules les composant. Ce type de reconstruction rend possible la détermination précise de données jusque-là inédites.

Les données morphométriques obtenues à partir d'unités néphriques des 3 embryons humains confirment celles de l'unique autre représentation graphique récemment publiée (Dingemanse and Lamers, 1994 [17]). Le protocole informatique, basé sur l'utilisation de coupes sériées histologiques, a permis d'obtenir des mésonéphros

tridimensionnels plus précis que ceux réalisés par AUTOCAD (Machin *et al*, 1996 [65]).

En effet, gOcad reconstruit les embranchements et les surfaces ré-entrantées ce qui lui confère un atout. Par exemple, seules de simples jonctions entre les tubules mésonéphritiques et les cônes efférents ont été reconstruites chez l'humain (Saitoh *et al*, 1990 [106]) alors que l'étude aurait pu se poursuivre jusqu'aux connexions avec les tubes droits du rete testis. Cette méthode présente l'avantage de reconstruire des connexions et des objets complexes. Elle facilite la visualisation de chacune des surfaces partiellement créées ainsi que l'observation dans leur ensemble. La possibilité d'assembler les surfaces déjà créées permet de mieux prévoir la reconstruction des surfaces voisines et d'éventuellement de corriger une mauvaise interprétation. La potentialité de multiplier les points de vue pallie aux difficultés de réalisation des représentations graphiques (Mac Callum, 1902 [64] ; Shikinami, 1926 [113] ; Altschule, 1930 [1] ; Dingemans and Lamers, 1994 [17]).

Les limites d'exploitation des régions mésonéphritiques étudiées sont liées à la proximité des structures les unes par rapport aux autres, à leur imbrication et à la complexité de leur enroulement.

L'étude du développement du mésonéphros humain a permis de conforter les observations précédentes (Mac Callum, 1902 [64] ; Shikinami, 1926 [113] ; Altschule, 1930 [1] ; Dingemans and Lamers, 1994 [17]). Les mésonéphros reconstruits confirment les données connues sur la forme des unités néphriques, sur le nombre de tubules mésonéphritiques et sur le sens rostro-caudal d'apparition des tubules.

En plus, le mésonéphros embryonnaire femelle de 7 semaines d'âge rapporte l'existence d'une structure multi-vésiculaires.

Cependant, cette étude ne permet pas de définir précisément le mode de formation des tubules mésonéphritiques ; les résultats obtenus ne permettent pas de déterminer si les tubules isolés viennent fusionner avec le canal de Wolff ou si les tubules émergent du canal de Wolff. Le concept le plus ancien est le mode de formation par fusion de petits tubules isolés au canal de Wolff (Dubreuil, 1947 [21]).

D'après Du Bois (1969), ce sont les tubules intermédiaires qui participeraient à la formation du rete. Les 2 premiers stades étudiés montrent que les tubules liés se localisent tout le long du canal de Wolff. Seul le mésonéphros de 7 semaines d'âge,

femelle, présente un regroupement des tubules liés, dans la portion la plus rostrale du mésonéphros. Ces tubules rostraux sont courts et droits et participeront probablement à la formation du rete ovarii. L'analyse de ces 3 mésonéphros ne permet pas de mettre en évidence l'origine des tubules impliqués dans la formation du rete.

4.1.2. Dans le mésonéphros d'embryon murin

Les mésonéphros murins obtenus montrent la répartition des tubules au cours de leur développement mais offrent aussi la possibilité de les visualiser sous n'importe quel angle. Ceci n'est pas le cas de la technique histochimique *in toto* pratiquée sur des tubules mésonéphritiques de rat et de souris (Sainio *et al*, 1997 [105]).

D'ailleurs, la mobilité des objets reconstruits permet de déceler des éléments qui peuvent être cachés par d'autres. Les mésonéphros murins reconstruits fournissent un rendu incomparable par rapport aux représentations graphiques réalisées au début de ce siècle par J. Bovy (Figure 4 ; Bovy, 1929 [8]). En outre, gOcad dispose d'un outil de lissage, DSI, améliorant la qualité de l'image et conférant aux reconstructions réalisées une représentation plus proche de l'objet réel. Le programme « REYES », qui a reconstruit la connexion entre le bourgeon métanéphrique et le canal de Wolff chez un embryon de souris *ld¹/ld¹* de 12 jours, ne corrigeait pas l'aspect dentelé de la reconstruction (Maas *et al*, 1994 [63]). Ces indentations dues à des phénomènes de distorsion sur les coupes histologiques limitent la qualité du rendu visuel. Par ailleurs, des reconstructions 3D d'embryons de 9 jours ont été réalisées à partir de coupes histologiques sériées et ont permis de réaliser un atlas anatomique du développement embryonnaire de la souris jusqu'à 14 jours (Kaufman *et al*, 1997 [49]). La qualité de cet atlas digital permet d'envisager une cartographie 3D de l'expression des gènes et des lignées cellulaires.

L'étude du développement du mésonéphros murin, a apportée plusieurs éléments.

Tout d'abord, aucun néphrostome bien défini n'a été rencontré. Or, il a été décrit à 11 jours, 3 néphrostomes dans la portion rostrale du mésonéphros et 3 autres à proximité de la région gonadique (Brambell, 1928 [9]). Selon cet auteur, les néphrostomes participeraient à la formation du rete.

D'autres travaux sur des souris *wt1^{-/-}* ont montré que les tubules rostraux liés avaient une origine wolffienne, et que les tubules caudaux isolés provenaient du

mésenchyme mésonéphritique (Sainio *et al*, 1997 [105]). Les études menées grâce à gOcad permettent d'observer des tubules rostraux isolés, qui proviendraient probablement de la dégénérescence des tubules mésonéphritiques rostraux voisins liés au canal de Wolff.

Les reconstructions réalisées ont permis de mettre en évidence une différenciation mâle-femelle dans l'organisation des tubules de 11,5 à 13,5 jours. En effet, une structure réticulée caractériserait les mésonéphros d'embryons femelles et serait absente des mésonéphros d'embryons mâles. Des travaux sur la structure tridimensionnelle de la crête génitale au cours de son développement embryonnaire ont été réalisés à partir de coupes confocales sagittales (Karl and Capel, 1995 [47]). Celles-ci ont permis d'observer des connexions cellulaires entre 3 à 6 tubules mésonéphritiques et la gonade. Ces coupes confocales peuvent faciliter la détection localisée de bifurcations, par contre, elles empêchent une vue de l'ensemble des tubules et donc de discerner un aspect différencié mâle-femelle dans l'organisation de ces tubules.

4.2. Développement et organisation des connexions uro-génitales d'origine mésonéphritique (Tableaux 33 et 34)

Les tubules mésonéphritiques se développent à partir du mésenchyme intermédiaire. Chez l'Homme, ils se différencient en glomérules vascularisés, alors que chez la Souris, le mésonéphros est vestigial. Au cours de son évolution, une trentaine de paires de néphros chez l'Homme et une dizaine chez la Souris se répartissent le long du mésonéphros. A la fin de la différenciation, seuls quelques tubules participeront à la formation du rete.

Tableau 33 : Schéma récapitulatif des données obtenues par l'interprétation des reconstructions 3D réalisées.

	MESONEPHROS HUMAINS		MESONEPHROS MURINS	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Origine des tubules liés	Le canal de Wolff ?		Le canal de Wolff	
Origine des tubules isolés rostraux	?		Les tubules mésonéphritiques en régression	
Origine des tubules isolés caudaux	?		Le mésenchyme environnant	
Bifurcation	-	-	Oui	Oui
Enroulement en S	Oui	Oui	Dès 10,5 jours	Dès 10,5 jours
Enroulement caudogyre*	Non	Non	Oui	Oui
Enroulement rostogyre*	Non	Non	Rare et toujours en position caudale*	Présente surtout dans la formation des structures réticulées
Structure multivésiculaires	-	Apparition à 7 semaines d'âge *	Non	Non
Formation du rete	-		Probablement par concentration des tubules les plus rostraux	Par anastomose des émergences des tubules mésonéphritiques les plus rostraux
Aspect différencié des mésonéphros	-		Les tubules courts émergent, puis à la suite de bifurcations vont descendre en spirales	Les tubules forment une structure réticulée dès 11,5 jours, à partir de plusieurs bifurcations

Abréviations :

- : pas suffisamment d'éléments pour émettre une réponse,

? : rien ne permet de conclure,

* : les éléments nouveaux observés sur les reconstructions réalisées.

Tableau 34 : Représentation schématique des caractéristiques des 2 espèces.

LES ELEMENTS COMMUNS :	LES ELEMENTS DIVERGENTS :
<ul style="list-style-type: none"> • un nombre prédéterminé de tubules*, • une orientation des tubules vers la portion rostrale de la gonade, • une forme spiralée des tubules*, • un enroulement caudogyre* des tubules mésonéphritiques droits vers la gonade droite, • l'existence de tubules isolés rostraux et caudaux*, • l'existence de tubules liés au canal de Wolff de forme plus ou moins complète, • un regroupement, dans la portion rostrale du mésonéphros, des tubules qui participeront probablement à la formation du rete. 	<ul style="list-style-type: none"> • la taille et la période de développement, • le mode de formation des tubules : (chez l'Homme : par fusionnement (?) des unités néphriques munies de capsules de Bowman, de structure multivésiculaires, aucune bifurcation n'a été visualisée, chez la Souris : par émergence du canal de Wolff avec des bifurcations et sous forme de structure réticulée), • l'aspect des tubules mésonéphritiques (chez l'Homme : unité avec une capsule de Bowman ; chez la Souris : simple tubule contourné), • l'existence d'unités néphriques complètes, rattachées au canal de Wolff, dans la portion caudale du mésonéphros humain, • la fonctionnalité uniquement chez l'Homme.

Abréviation :

* : les éléments nouveaux observés sur les reconstructions réalisées.

4.2.1. Dans les mésonéphros d'embryons humains

4.2.1.1. Les tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff

Les reconstructions 3D de mésonéphros humains révèlent la présence de 23 et 24 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff entre 4 et 6 semaines d'âge. Ceux-ci suggèrent que les premiers tubules persistent au cours du développement du mésonéphros.

A 7 semaines d'âge, l'embryon humain possède 18 tubules mésonéphritiques courts et droits ; accompagnés de 16 autres tubules dont les capsules s'interconnectent entre elles formant une structure multi-vésiculaires. A ce stade, il est fort probable que les tubules, les plus rostraux et liés au canal de Wolff, participent à la formation du rete.

Le mode de formation des tubules reste à définir, car rien ne permet de confirmer que la fusion d'un tubule ou d'une unité néphrique isolée avec le canal de Wolff soit le mode effectivement utilisé. En effet, certains éléments mésonéphritiques possèdent une capsule de Bowman développée dont la connexion avec le canal de Wolff est rudimentaire. Ces éléments suggèrent l'existence de mécanismes supplémentaires de régulation.

4.2.1.2. Les tubules mésonéphritiques isolés

Les tubules isolés du canal de Wolff sont aussi nombreux que les tubules qui lui sont liés. Les 2 premiers stades comportent 24 et 27 tubules isolés alors qu'à 7 semaines d'âge, ils sont 18 éléments localisés dans la portion la plus rostrale.

4.2.1.3. Structure multi-vésiculaires

L'existence d'une structure multi-vésiculaires dans le mésonéphros d'embryon femelle de 7 semaines d'âge a été démontrée au niveau de sa portion la plus caudale. Les études sur le développement du mésonéphros humain n'ont encore jamais décrit une telle structure.

4.2.1.4. *Enroulement en S*

Les tubules droits liés ou non au canal de Wolff présentent un enroulement en S dirigé vers la gonade droite. Cet enroulement est limité car l'unité mésonéphritique est constituée uniquement d'un tubule proximal, d'un tubule distal et de sa capsule de Bowman.

4.2.1.5. *Formation du rete*

Les tubules mésonéphritiques contribuant à la formation du rete et participant aux connexions cônes efférents-rete sont probablement les tubules les plus rostraux du mésonéphros de 7 semaines d'âge. Leurs tubules rostraux sont courts, fins et se dirigent vers la portion la plus rostrale de la gonade. Le passage de 6 à 7 semaines d'âge marque un regroupement rostral de l'ensemble des tubules mésonéphritiques. A 6 semaines, 23 tubules sur 51 se localisent rostralement, alors qu'à 7 semaines, 36 sur 37 envahissent une zone limitée de la portion rostrale.

4.2.2. Dans les mésonéphros d'embryons murins

Deux types de tubules apparaissent dans les mésonéphros ; ceux qui sont liés au canal de Wolff et ceux qui ne le sont pas.

4.2.2.1. *Les tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff*

Les mésonéphros d'embryons murins de 10,5 à 15,5 jours présentent de 4 à 7 tubules chez les mâles et de 2 à 8 tubules chez les femelles. Des coupes confocales sur des mésonéphros d'embryons de 11,5 à 13,5 jours ont permis de dénombrer 3 à 6 tubules mésonéphritiques (Karl and Capel, 1995 [47]). Ces résultats sont en concordance avec ceux des reconstructions et permettent de suggérer que le nombre de tubules est probablement prédéterminé. Par exemple, le mésonéphros 2 de 10,5 jours (Figure 56) présente 3 tubules mésonéphritiques qui correspondent à 3 groupes de tubules. De ces derniers vont se dégager d'autres tubules permettant de constituer 6 tubules.

Dès 10,5 jours, de très courts tubules sont liés à la portion rostrale du corps de Wolff des mésonéphros reconstruits. Cette observation suggère que le mode de différenciation des tubules, chez les muridés, n'est probablement pas une fusion de tubules mésonéphritiques avec le canal de Wolff. Il s'agirait plutôt d'une émergence de tubules à partir du corps de Wolff. Les travaux de Sainio *et al*, (1997 [105]) sur des souris homozygotes *wt1^{-/-}* ont montrés une absence de tubules isolés. Seuls les tubules liés au canal de Wolff persistent. Leurs observations suggèrent un mode de régulation distinct selon que les tubules sont liés ou non au canal de Wolff.

Entre 10,5 et 11,5 jours, des bifurcations se produisent. Ces bifurcations se dégageraient des amas cellulaires pour donner des tubules mésonéphritiques (mésonéphros 2 ; Figure 56). A partir de plusieurs bifurcations, les extrémités médiales des tubules spiralés de mésonéphros d'embryon femelle s'interconnectent pour participer à l'élaboration d'une structure réticulée (mésonéphros 10 à 12 ; Figure 65).

4.2.2.2. Les tubules mésonéphritiques isolés

Les tubules isolés apparaissent progressivement dans la portion caudale des mésonéphros de 10,5 à 12,5 jours. A la fin de cette période, ils sont les plus nombreux. Dans le mésonéphros 9 de 12,5 jours, 24 tubules ont été identifiés et leur localisation s'étend à la portion rostrale.

Le stade 13,5 jours permet de supposer que les tubules mésonéphritiques isolés ont une origine distincte selon qu'ils sont positionnés rostralement ou caudalement. Les mésonéphros 8 et 9 de la Figure 67 permettent de suggérer que les tubules isolés rostraux proviendraient des tubules liés voisins (Figure 83). Les tubules isolés caudaux ont un profil similaire aux tubules liés, ils apparaissent sous forme de tubes droits, puis se courbent en J, ensuite en S. Ce mode de formation suggère que les mécanismes moléculaires participatifs au développement des tubules isolés seraient de même nature que ceux contribuant à l'émergence et à la formation des tubules liés au canal de Wolff.

4.2.2.3. Aspect différencié

Parmi les éléments nouveaux qu'apportent notre étude sur le mésonéphros murin, il faut souligner l'aspect de la différenciation mâle-femelle. La première structure différente entre les 2 sexes est la structure réticulée présente entre 11,5 et 13,5 jours. A

partir de 5 points d'émergence du canal de Wolff à 11,5 jours et à partir de 2 points d'émergence à 13,5 jours, vont se produire des bifurcations. De ces bifurcations, les tubules mésonéphritiques vont s'interconnecter entre eux donnant un aspect réticulé au seul mésonéphros d'embryon femelle (Figures 88 et 90).

4.2.2.4. Enroulement caudogyre

De plus, les mésonéphros droits des 2 sexes présentent un enroulement caudogyre de leurs tubules vers la gonade droite de 10,5 à 13,5 jours. Cet enroulement est perdu avec la mise en place du processus de régression au niveau de l'extrémité médiale des tubules liés au canal de Wolff ; ceux-ci se réduisent à des tubes droits.

4.2.2.5. Formation du rete

Les tubules liés au canal de Wolff qui s'étendent tout le long de la portion rostrale du corps de Wolff à 10,5 jours vont se concentrer rostralement dès 13,5 jours. A 15,5 jours, les extrémités médiales des tubules des mésonéphros mâles gardent un aspect curvilinéaire et leurs extrémités latérales s'anastomosent entre elles (Figure 92). Par contre, les mésonéphros femelles présentent une structure réticulée qui tend à disparaître pour ne laisser la place qu'à des tubes droits (Figure 93). Il est possible d'observer sur les coupes histologiques 2 phénomènes :

- à 13,5 jours, les tubules isolés rostraux participent à l'établissement des connexions avec la gonade,
- et de 13,5 à 15,5 jours, les extrémités médiales de certains tubules liés au canal de Wolff participent, eux aussi, aux connexions. Les tubules entrant dans la connexion semblent être, le plus souvent, des tubules intermédiaires.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1. Les mésonéphros humains reconstruits

La reconstruction 3D a permis de réaliser une série de mésonéphros humains qui définit les éléments suivants. Tout d'abord, une réduction de 23 à 18 tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff des embryons de 4 à 7 semaines d'âge, accompagnée d'une concentration rostrale des tubules qui s'étendent vers la gonade. Parallèlement, 11 unités néphriques sont présentes dans le mésonéphros de 4 semaines d'âge. Leur nombre s'élève à 18 unités dans le mésonéphros de 6 semaines d'âge. Puis, sur le dernier mésonéphros reconstruit de 7 semaines, seuls 7 unités persistent.

L'étude pourrait être étendue dans 2 directions. D'une part, l'évaluation morphologique de l'apparition des tubes nécessiterait l'étude d'un stade antérieur au stade 15. Les descriptions actuelles de l'apparition des tubules mésonéphritiques suggèrent que ce sont des unités isolées qui viendraient fusionner avec le canal de Wolff (Arey, 1965 [2] ; Larsen, 1993 [58]). Dans les mésonéphros de 4 et 6 semaines d'âge, les tubules isolés se répartissent tout le long du canal de Wolff, alors que dans le mésonéphros de 7 semaines d'âge, ils ne sont présents que sous forme de simples tubules et localisés que dans la portion rostrale. D'autre part, l'évaluation plus fine de la transition de 6 à 7 semaines d'âge permettrait de décrire l'origine des tubules les plus rostraux. Il a été observé un regroupement des tubules dans la portion rostrale avec une réduction de 24 à 18 des tubules liés et une augmentation de 13 à 18 des tubules isolés (Tableau 11). Par ailleurs, des observations sur ces mésonéphros d'embryons humains de 4 à 7 semaines d'âge ont montré la présence de cellules qui se séparent les unes des autres au niveau des extrémités proximales des tubules les plus rostraux, puis migrent dans le blastème environnant (Luciani and Gérard, 1986 [62]).

5.2. Les mésonéphros murins reconstruits

Les reconstructions 3D ont permis de définir une série de mésonéphros murins. Cette étude a facilité le dénombrement des tubules dans chaque mésonéphros reconstruits. Entre 10,5 et 15,5 jours, dans le mésonéphros d'embryons mâles, 4 à 7 tubules mésonéphritiques ont été décrits. Au cours de cette même période, 2 à 8 tubules mésonéphritiques sont liés au canal de Wolff du mésonéphros d'embryons femelles.

Les reconstructions ont apporté des informations morphologiques sur les tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff. A partir de leurs points de jonction avec le canal de Wolff, des changements brutaux dans leur forme se produisent dès le début du développement. Après leur émergence, les tubes droits croissent latéralement, se courbent en J puis en S, puis s'enroulent en spirale. L'enroulement de ces tubules mésonéphritiques droits vers la gonade droite est caudogyre (vers l'extrémité caudale de l'embryon). A certains points d'émergence du canal de Wolff apparaît une bifurcation. A la suite de chaque bifurcation, les branches tubulaires présentent un enroulement caudogyre ou rostrogyre (vers l'extrémité rostrale de l'embryon). Les extrémités médiales de ces tubules s'interconnectent entre elles formant une structure réticulée. Celle-ci est observable uniquement dans les mésonéphros femelles, à partir de 11,5 jours. Les analyses quantitatives des données morphométriques mettent l'accent sur l'existence d'une différence entre mâle et femelle de 11,5 à 14,5 jours dans la forme et dans l'orientation des tubules, confirmé par une structure réticulée rostrale dans les mésonéphros femelles.

Les images synthétisées en 3D ont permis d'étudier l'apparition et le développement des tubules isolés par leur localisation, leur changement de forme et de taille. De 10,5 à 12,5 jours, le nombre de tubules mésonéphritiques isolés croît jusqu'à 24. L'apparition des tubules est caudale. Ils sont courts et droits, prennent la forme d'un J, puis d'un S. Les premiers à prendre une forme en S sont les plus proches des tubules liés au canal de Wolff, alors que les plus caudaux sont encore sous forme de tubes droits et courts. A 12,5 jours, d'autres tubules apparaissent, ils sont isolés et rostraux. Ces tubules ne présentent pas un mode de formation progressif. Leur nombre diminue jusqu'à disparaître à 14,5 et 15,5 jours.

Cette étude a permis de mettre en évidence un changement d'orientation des tubules liés au canal de Wolff entre 13,5 et 14,5 jours, pour les mésonéphros femelles. Les tubules prennent la forme de tubes droits ; leurs extrémités latérales ont tendance à se regrouper, alors que leurs extrémités médiales perdent leur aspect contourné. Dès 13,5 jours, les tubules mésonéphritiques mâles se regroupent progressivement dans la portion rostrale du mésonéphros et laissent apparaître des zones de jonctions entre les extrémités latérales des tubules. Dans les mésonéphros femelles, le mécanisme de dégénérescence apparaît clairement vers 13,5 jours au niveau de la courbure des boucles des tubules et des bifurcations réduisant ceux-ci à des tubes linéaires ou droits.

L'étude de cette série de mésonéphros par la reconstruction 3D suggère de l'étendre à des âges plus rapprochés les uns des autres. La période à subdiviser serait celle couvrant de 11 à 16 jours. Celle-ci permettrait de mieux visualiser l'apparition des bifurcations, des interconnexions entre les tubules et le mode de formation des tubules isolés rostraux. La structure réticulée est probablement une étape intermédiaire plus importante et plus précoce dans les mésonéphros d'embryons femelles que dans les mésonéphros d'embryons mâles. Il est probable que la formation de cette structure réticulée soit un « marqueur » de dégénérescence. Dans les mésonéphros d'embryons mâles de 14,5 et de 15,5 jours, le tubule mésonéphritique, le plus caudal, connecté au canal de Wolff présente des interconnexions. Ces interconnexions, localisées sur les extrémités médiales, semblent apparaître sur des tubules qui pourraient participer à la formation du rete.

Par ailleurs, il serait intéressant de reconstruire de 11 à 16 jours, conjointement, l'extrémité caudale du canal de Wolff avec son uretère et son sinus urogénital. La situation du bourgeon métanéphrique par rapport aux tubules isolés permettrait probablement d'apporter des réponses sur leur rôle en fonction de leur période d'apparition et de disparition.

Ces résultats apportent des éléments nouveaux qui permettent d'envisager l'étude de certaines coupes histologiques.

A 10,5 jours, au niveau des tubules émergents du mésonéphros 2 mâle (*lb, lc* ; Figure 56), du mésonéphros 8 mâle (*lb, ld* ; Figure 57), et du mésonéphros 11 femelle

(*la*, *lc*, *ld*; Figure 58), la mesure d'une activité cellulaire sur les bifurcations permettrait d'expliquer comment les tubules se dégagent du corps de Wolff.

Les tubules rostraux isolés apparaissant à 12,5 jours dans le mésonéphros 8 de la Figure 65 pourraient être comparés aux tubules caudaux isolés. L'observation de ce mésonéphros montre seulement que les tubules rostraux isolés (*if* à *ip*) sont plus contournés et plus volumineux que les caudaux (*iq* à *id'*), mais n'apporte aucune information sur l'origine des tubules isolés rostraux. Leur origine wolffienne ne peut pas être affirmée. Il serait intéressant de mettre en évidence le lien entre les tubules liés et les tubules isolés voisins par la présence ou non de cellules apoptotiques. Si effectivement, des cellules apoptotiques étaient détectées, il conviendrait d'appliquer en parallèle l'étude sur le mésonéphros 9, qui appartient à la même portée et qui ne présente pas encore de tubules rostraux isolés. De plus, il semblerait que les tubules isolés rostraux contribueraient à la mise en place des connexions uro-génitales.

A 13,5 jours, les mésonéphros femelles 11 et 12 de la Figure 68 présentent encore des bifurcations en plus de la structure réticulée. Il serait intéressant de comparer l'activité cellulaire entre les mésonéphros mâles et femelles au niveau des bifurcations mais aussi des extrémités médiales des tubules liés au canal de Wolff pour les mésonéphros mâles et des zones de connexions entre les différents tubules constitutifs de la structure réticulée pour les mésonéphros femelles afin de comprendre ce qui empêche les tubules mésonéphritiques des mésonéphros d'embryons mâles de s'interconnecter entre eux et donc de réaliser une structure réticulée.

Sur un mésonéphros femelle de 15,5 jours, les processus de régression pourraient être étudiés. Par exemple, le mésonéphros 11 de la Figure 74 présente des signes de régression sur le canal de Wolff. Sur ce mésonéphros figure encore la partie la plus caudale *lc* d'une structure réticulée, alors que les tubules les plus rostraux *la*, *lb*, réduits à des tubes droits, ont perdu leurs connexions avec le tubule caudal *lc*. Dans les mésonéphros mâles 2 et 3 (Figure 72), en plus de la zone latérale de regroupement, il apparaît, aux extrémités médiales des tubules, des boucles qui pourraient faire l'objet de processus terminaux de régression. Les reconstructions 3D obtenues offrent donc la possibilité de mieux cibler les zones de dégénérescence.

5.3. Apports de cette étude dans le rôle du mésonéphros dans l'engagement de la voie de développement de la gonade.

La contribution cellulaire du mésonéphros dans le testicule en développement est probablement un processus continu, commençant au 10^{ème} jour jusqu'au 12^{ème} jour. De récents travaux ont montré l'existence d'une contribution continue du mésonéphros à partir de 11,5 jours (Buehr *et al*, 1993 [10]). Ces auteurs ont montré que le mésonéphros était nécessaire à l'établissement d'une architecture normale du testicule et qu'il serait à l'origine des cellules interstitielles et périlitulaires de la gonade.

Par ailleurs, des analyses histologiques montrent que les cellules de Sertoli dérivent en totalité ou partiellement du mésonéphros (Upadhyay *et al*, 1981 [126]; Wartenberg, 1981a [133]; 1981b [134]; 1991 [135]). A ce stade, rien ne permet d'expliquer un aspect différencié des mésonéphros mâles et femelles. Récemment, il a été découvert que le gène murin Sry était exprimé au niveau des cellules somatiques de la crête génitale de 10,5 à 11,5 jours (Koopman *et al*, 1990 [53], 1991[54]). Les expériences sur des souris chimères XX/XY ont montré que pratiquement la totalité des cellules de Sertoli étaient XY alors que dans les autres types cellulaires du testicule, le rapport de cellules XX/XY était le même que dans les autres tissus (Burgoyne *et al*, 1988 [11]; Palmer and Burgoyne, 1991a [88]; Patek *et al*, 1991 [91]). Ces travaux suggèrent que l'action de Sry s'effectue en grande partie de manière autonome dans les cellules de Sertoli. Par ailleurs, des observations effectuées sur des mésonéphros de 11,5 jours, en microscopie confocale, ont mis en évidence l'existence de 3 à 6 connexions entre les tubules mésonéphritiques et le primordium gonadique. Pour Karl and Capel (1995) [47], ces ponts cellulaires étant visibles dans les mésonéphros mâles et femelles, l'organisation structurelle de ces ponts ne dépend pas de l'expression du gène Sry.

Les reconstructions obtenues dans ce travail, avant que la gonade ne soit différenciée, dès 11,5 jours, montrent une organisation particulière des tubules mésonéphritiques dans les mésonéphros d'embryons femelles. A la suite de bifurcation, les tubules mésonéphritiques femelles s'organisent en une structure réticulée, alors que les tubules mésonéphritiques mâles se développent sans interconnexions des extrémités médiales.

5.4. Les domaines d'applications

Aborder la reconstruction du système uro-génital complet, au cours du développement embryonnaire, représenterait un apport supplémentaire d'informations. De récents travaux réalisés sur l'embryon de souris de 11 jours apportent une représentation fidèle des relations topographiques de structures complexes comme l'appareil circulatoire, le système nerveux central et le foie (Weninger *et al*, 1998 [136]). Une telle reconstruction du système dans son entier permettrait de considérer les interactions entre les deux appareils urinaire et génital et de mieux suivre la dynamique de l'un par rapport à l'autre.

Les travaux présentés pourraient contribuer aux prémices d'un atlas 3D du mésonéphros. Il serait intéressant de constituer une grande banque de données sur l'expression des gènes en les inscrivant dans des cartes 3D anatomiques d'embryons humains et murins comme certains le projettent déjà (Ringwald *et al*, 1994 [100]; Kaufman *et al*, 1997 [49]). Par ailleurs, l'intérêt d'avoir suivi le développement normal du mésonéphros humain et murin par reconstruction intégrale des tubules mésonéphritiques est de tenter d'en disposer comme d'une référence et de la comparer à un développement anormal des tubules mésonéphritiques comme dans le cas d'agénésie rénale, de tumeur de Wilms... En parallèle, la génétique comparée, et en particulier le couple homme/souris, devrait jouer un rôle de plus en plus important dans la compréhension du développement du mésonéphros et de la contribution du génome. L'analyse tridimensionnelle enrichit donc maintenant l'arsenal de la biologie du développement du mésonéphros.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Altschule, M.D., (1930) The changes in the mesonephric tubules of human embryos ten to twelve weeks old. *Anat. Rec.*, 46 : 81-91.
- [2] Arey, L.B., (1965) The urinary system. In: « Developmental anatomy. A textbook and laboratory manual of embryology ». Philadelphia and London: Saunders, W. B., Company, chap. XVII, pp. 295-301.
- [3] Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D., and Bard, J. B. L., (1992) The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.*, 40 : 85-97.
- [4] Barbaux, S., Vilain, E., McElreavey, K., and Fellous, M., (1995) Le point sur le déterminisme du sexe chez les mammifères. *Med. Sci.*, 11 : 529-536.
- [5] Berta, P., Ross Hawkins, J., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., and Fellous, M., (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348 : 448-450.
- [6] Bettega, G.A., (1992) La recherche de la quatrième dimension. Thèse Doctorale de l'Université Joseph Fourier, Faculté de Médecine de Grenoble.
- [7] Boissonnat, J.D., (1988) Shape reconstruction from planar cross-sections. *Comput. Vis. Graph. Image. Proc.*, 132 : 240-259.
- [8] Bovy, J., (1929) Recherches sur le corps de Wolff et l'origine des connexions urogénitales chez la souris. *Arch. Biol.*, 39 : 139-174.

- [9] Brambell, F.W.R., (1928) The development and morphology of the gonads of the mouse. Part II. The development of the Wolffian body and ducts. Proc. Roy. Soc. Lond. [Biol.], 102 : 206-221.
- [10] Buehr, M., Subin, G. U., and McLaren, A., (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, 117 : 273-281.
- [11] Burgoyne, P.S., Buehr, M., Koopman, P., Rossant, J., and McLaren, A., (1988) Cell-autonomous action of the testis-determining gene : Sertoli cells are exclusively XY in XX-XY chimaeric mouse testes. *Development*, 102 : 443-450.
- [12] Burgoyne, P.S., and Palmer, S., (1993) Cellular basis of sex determination and sex reversal in mammals. In : « Gonadal development and function ». New York : Raven Press.
- [13] Byskov, A.G., and Høyer, P. E., (1988) Embryology of mammalian gonads and ducts. In « The physiology of reproduction ». New York : Knobil, E., and Neill, J., Raven Press, chap.8, pp.265-302.
- [14] Catmull, E., (1974) A subdivision algorithm for computer display of curved surface. Ph. D. Thesis University of Utah, Salt lake city.
- [15] Davidson, D. R., Baldock, R. A., Bard, J. B. L., Kaufman, M. H. and Dubreuil, C., (1998) The mouse atlas and gene expression database project. <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>
- [16] Dehbi, M., and Pelletier, J., (1996) Pax-8 mediated activation of WT1 tumor suppressor gene. *EMBO J.*, 15 : 4297-4306.
- [17] Dingemans, M.A., and Lamers, W.H., (1994) Expression patterns of ammonia-metabolizing enzymes in the liver, mesonephros, and gut of human embryos and their possible implications. *Ana. Rec.*, 238 : 480-490.

- [18] Dollander, A., et Fenart, R., (1979) Développement définitif des formes extérieures et croissance du corps de l'embryon puis du fœtus. In : « Eléments d'embryologie ». Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 4^{ème} édition, chap. VI, pp.306-312.
- [19] Dressler, G., Wilkinson, F. E., Rothenpieler, V., Patterson, L., Williams-Simons, L., and Westphal, H., (1993) Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature*, 326 : 65-67.
- [20] Du Bois, A. M., (1969) The embryonic kidney. In : « The Kidney ». New York : Rouiller, C., and Muller, A.F., Academic Press, vol. I, pp.1-59.
- [21] Dubreuil, G., (1947) Appareil urinaire. In : « Embryologie humaine ». Paris VI : Vigot Frères, 3^{ème} édition, pp. 292-311.
- [22] Dyche, W.J., (1976) The cytology of involution of female Wolffian duct and male Mullerian duct in the fetal mouse. *Anat. Rec.*, 184 : 384 (Abstract).
- [23] Dyche, W.J., (1979) A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J. Morph.*, 162 : 175-210.
- [24] Farias, E., Kajii, T., and Gardner, L.I., (1967) Technique for investigation of sex chromatin in amniotic membrane of rat foetuses. *Nature*, 214 : 499-500.
- [25] Felix, W., (1912) The development of the urogenital organs. In : « Manual of human embryology ». Philadelphia and London : Keibel, F., and Mall, F.P., vol. 2, pp.752-979.
- [26] Fuchs, H., Kedem, Z.M., and Uselton, P., (1977) Optimal surface reconstruction from planar contours. *Comm. ACM*, 20 : 693-702.

- [27] Fujii, T., Pichel, J. G., Taira, M., Toyama, R., Dawid, I. B., and Westphal, H., (1994) Expression patterns of the murine LIM class homeobox gene *lim1* in the developing brain and excretory system. *Dev. Dynam.*, 199 : 73-83.
- [28] Gabe, M., (1968) *Techniques histologiques*. Paris : Masson (Eds).
- [29] Gaunt, P.N., and Gaunt, W.A., (1978) *Three dimensional reconstruction in biology*. London : Pitman Medical, pp.1-174.
- [30] Gérard, H., Bouchet, P., Jacquemin, P., Le Melinaire P., and Mallet, J.L., (1992) A new method for computer aided-3D reconstruction of the human embryo from serial, non consecutive, histologic sections. *Acta. Stereol.*, [suppl 1] 11 : 187-192.
- [31] Gérard, H., André, J.C., and Mallet, J.L., (1993) Computer-aided 3-D reconstructions from routine histologic sections. *Eur. Microsc. Anal.*, 1 : 23-25.
- [32] Gerke, M., Schütz, T., and Kretschmann, H.J., (1992) Computer-assisted 3D-reconstruction and statistics of the limbic system: 1. Computer-assisted 3D-reconstruction of the hippocampal formation, the fornix, and the mamillary bodies. *Anat. Embryol.*, 186 : 129-136.
- [33] Gerke, M., Schütz, T., and Kretschmann, H.J., (1992) Computer-assisted 3D-reconstruction and statistics of the limbic system: 2. Spatial statistics of the hippocampal formation, the fornix, and the mamillary bodies. *Anat. Embryol.*, 186 : 137-143.
- [34] Goret, C., (1990) *Etude d'une modélisation continue des volumes numériques. Applications à la visualisation de structures anatomiques*. Thèse Doctorale de l'Université Joseph Fourier , Grenoble.
- [35] Gouraud, H., (1971) Continuous shading of curved surfaces. *IEEE Trans. Comput.*, c-20, 6 : 623-629.

- [36] Graves, J. A. M., (1997) Two uses for old SOX. *Nat. Genet.*, 16 : 114-115.
- [37] Graves, J. A. M., (1998) Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *BioEssays*, 20 : 264-269.
- [38] Gruenwald, P., (1941) The relation of the growing Müllerian duct to the Wolffian duct and its importance for the genesis of malformations. *Anat. Rec.*, 81 : 1-19.
- [39] Gruss, P., and Walther, C., (1992) Pax in development. *Cell*, 69 : 719-722.
- [40] Gubbay, J., Collignon, J., and Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R., (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346 : 245-250.
- [41] Harrison, R. G., (1959) The urogenital system. In : « A textbook of human embryology ». Oxford : Blackwell Scientific Publications, chap. XVIII, pp.156-172.
- [42] Ikeda, Y., Lala, D. S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M. P., and Parker, K. L., (1993) Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.*, 7 : 852-860.
- [43] Jones, A.S., Milthorpe, B.K., and Howlett, C.R., (1994) Measurement of microtomy induced section distortion and its correction for 3-dimensional histological reconstructions. *Cytometry*, 15 : 95-105.
- [44] Jonté, G., and Holstein, A., (1987) On the morphology of the transitional zones from the rete testis into the ductuli efferentes and from the ductuli efferentes into the ductus epididymis. Investigation on the human testis and epididymis. *Andrologia*, 19 : 398-412.

- [45] Jost, A., (1972) Données préliminaires sur les stades initiaux de la différenciation du testicule chez le rat. *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exper.*, 61 : 415-438.
- [46] Jost, A., (1991) Les péripéties d'une recherche ; l'étude de la différenciation sexuelle. *Med. Sci.*, 7 : 263-275.
- [47] Karl, J., and Capel, B., (1995) Three-dimensional structure of the developing mouse genital ridge. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 350 : 235-242.
- [48] Kato, K., Kanamori, A., Wakamatsu, Y., Sawai, S., Kondoh, H., (1991) Tissue distribution of N-myc expression in the early organogenesis period of the mouse embryo. *Dev. Growth Differ.*, 33 (1) : 29-36.
- [49] Kaufman, M.H., Brune, R.M., Baldock, R.A., Bard, J.B.L., and Davidson, D., (1997) Computer-aided 3-D reconstruction of serially sectioned mouse embryos: its use in integrating anatomical organization. *Int. J. Dev. Biol.*, 41 : 223-233.
- [50] Keller, S. A., Jones, J. M., Boyle, A., Barrow, L. L., Killen, P. D., Green, D. G., Kapousta, N. V., Hitchcock, P. F., Swank, R. T., and Meisler, M. H., (1994) Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus. *Genomics*, 23 : 309-320.
- [51] Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E., Sinclair, A. H., and Koopman, P., (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 122 : 2813-2822.
- [52] Keppel, E., (1975) Approximating complex surfaces by triangulation of contour lines. *IBM J. Res. Dev.*, 19 : 2-11.

- [53] Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348 : 450-452.
- [54] Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 351 : 117-121.
- [55] Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R., (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74 : 679-691.
- [56] Kremer, J.R., Mastronade, D.N., and McIntosh, J.R., (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.*, 116 : 71-76.
- [57] Kumar, A., Wallner, E. I., Carone, F. A., Scarpelli, D. G., and Kanwar, Y. S., (1997) Relevance of proto-oncogenes as growth modulators in organogenesis of the mammalian embryonic kidney. *Int. J. Dev. Biol.*, 41 : 643-653.
- [58] Larsen, W.J., (1993). Development of the urogenital system In : « Human Embryology ». Churchill : DeBoeck Université, chap. 10, pp. 235-251.
- [59] Lawrence, W.D., Whitaker, D., Sugimura, H., Cunha, G.R., Dickersin, G. R., and Robboy, S.J., (1992) An ultrastructural study of the developing urogenital tract in early human fetuses. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 167 : 185-193.
- [60] Lombard-des-Gouttes, M. N., (1983) Développement de l'appareil uro-génital. In : « Traité de zoologie ». Paris : Masson, Tome XVI, Fasc. VII, pp.993-1059.
- [61] Lozanoff, S., and Deptuch, J.J., (1991) Implementing Boissonnat's method for generating surface models of craniofacial cartilages. *Anat. Rec.*, 229 : 556-564.

- [62] Luciani, J. M., and Gérard, H., (1986) The early relationship between the mesonephros and the gonadal blastema in staged human embryos. In : « In vitro fertilization congress », Vienna, (Abstract).
- [63] Maas, R., Elfering, S., Glaser, T., and Jepeal, L., (1994) Deficient outgrowth of the ureteric bud underlies the renal agenesis phenotype in mice manifesting the limb deformity (ld) mutation. *Dev. Dynam.*, 199 : 214-228.
- [64] Mac Callum, J.B., (1902) Notes on the Wolffian body of higher mammals. *Am. J. Anat.*, 1 : 245-328.
- [65] Machin, G.A., Sperber, G.H., Ongaro, I., and Murdoch, C. (1996) Computer graphic three-dimensional reconstruction of normal human embryo morphogenesis. *Anat. Embryol.*, 194 : 439-444.
- [66] Mallet, J.L., (1992) Discrete smooth interpolation in geometric modelling. *Comput. Aided. Des.*, 24 : 178-191.
- [67] Marko, M., and Leith, A., (1992) Contour-based 3-D reconstruction using stereoscopic contouring and digitized images. In : « Visualization in biomedical microscopies ». New York : Kriete, A., VCH, chap. 3, pp. 215-236.
- [68] Marko, M., and Leith, A., (1996) Stereocn-three-dimensional reconstructions from stereoscopic contouring. *J. Struct. Biol.*, 116 : 93-98.
- [69] Martoja, R., et Martoja, M., (1967) Initiations aux techniques de l'histologie animale. Paris : Masson, pp.2-57.
- [70] Mass, R. L., Zeller, R., Woychik, R. P., Vogt, T. F., and Leder, P., (1990) Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature*, 346 : 853-855.

- [71] McLaren, A., and Buehr, M., (1990) Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ. Dev.*, 31 : 185-195.
- [72] Membre, H., (1990) Etude de l'ostéogénèse dans différentes conditions expérimentales. Thèse Doctorale de l'Université de Nancy I.
- [73] Merchant-Larios, H., (1979) Origin of the somatic cells in the rat gonad : an autoradiographic approach. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19 (4B) : 1219-1229.
- [74] Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., and Buehr, M., (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.*, 37 : 407-415.
- [75] Mintz, B., (1957) Germ cell origin and history in the mouse : genetic and histochemical evidence. *Anat. Rec.*, 127 : 335-336.
- [76] Molé, C., Gérard, H., Marchal, A., Bouchet, P., Della Malva, R., Mallet, J.L., Corbel, S., and Miller, N., (1993). Implémentation de nouvelles technologies de modélisation 3-D et de reconstruction plastique des structures maxillo-mandibulaires en implantologie dentaire. *Actualités en Biomatériaux*, 2 : 281-288.
- [77] Molé, C., Gérard, H., Mallet, J.L., Chassagne, J. F., and Miller, N., (1995) A new three-dimensional treatment algorithm for complex surfaces: applications in surgery. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 53(2) : 158-162.
- [78] Molé, C., (1996) Intérêts de procédés de nouvelles technologies en chirurgie expérimentale : implémentations de données médicales en modélisation surfacique 3D et en reconstruction plastique par stéréophotolithographie laser. Thèse Doctorale de l'Université Henri Poincaré, Nancy I.

- [79] Montgomery, K., and Ross, M.D., (1996) A method for semiautomated serial section reconstruction and visualization of neural tissue from TEM images. [http://biocomp.arc.nasa.gov/3d reconstruction](http://biocomp.arc.nasa.gov/3d_reconstruction).
- [80] Moore, K L., (1974) Appareil uro-génital. Appareils urinaire et génital. In : « L'être humain en développement ». Paris :Vigot Frères, chap. 13, pp. 199-218.
- [81] Moore, M. W., Klein, R. D., Fariñas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K., and Rosenthal, A., (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382 : 76-79.
- [82] Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P. N., Swain, A., and Lovell-Badge, R., (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Gen.*, 14 : 62-68.
- [83] Morel, Y., Portrat-Doyen, S., Calemard-Michel, L., and Seffert, O., (1997) Détermination sexuelle, In : « 2^{ème} journée de médecine fœtale de Briançon », Briançon, pp. 43-48.
- [84] Mugrauer, G., and Ekblom, P., (1991) Contrasting expression patterns of three members of myc family of proto-oncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J. Cell Biol.*, 112 : 13-25.
- [85] Ongaro, I., Sperber, G.H., Machin, G.A., and Murdoch, C.A., (1991) Fiducial points for three-dimensional computer-assisted reconstruction of serial light microscopic sections of umbilical cord. *Anat. Rec.*, 229 : 285-289.
- [86] Oukda, M., François, M., Membre, H., Bautz, A., and Dournon, C., Crystallographic and chemical composition of otoconia in the salamander : *Pleurodeles waltl*. *Hear. Res.*, (en préparation).

- [87] Pachnis, V., Mankoo, B., and Costantini, F., (1993) Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*, 119 : 1005-1017.
- [88] Palmer, S. J., and Burgoyne, P. S., (1991a) In situ analysis of fetal prepuberal and adult XX-XY chimeric mouse testes : Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*, 112 : 265-268.
- [89] Palmer, S. J., and Burgoyne, P. S., (1991b) XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/XYY mosaic mice. *Development*, 111 : 1017-1020.
- [90] Pansky, B., (1986). L'appareil urinaire : Le mesonephros. In : «Embryologie Humaine». Paris : Ellipses Edition Marketing, pp. 238-263.
- [91] Patek, C. E., Kerr, J. B., Gosden, R. G., Jones, K. W., Hardy, K., Muggleton-Harris, A. L., Handyside, A. H., Whittingham, D. G., and Hooper, M. L., (1991) Sex chimerism, fertility and sex determination in the mouse. *Development*, 113 : 311-325.
- [92] Payen, E., Barbaux, S., and Fellous, M., (1996) Le déterminisme génétique du sexe. In : «Endocrinologie masculine». Paris : Doin éditeurs, Progrès en Andrologie, 6, chap. 1, pp.3-14.
- [93] Phong, B.T., (1975) Illumination for computer generated pictures. *Commun. ACM.*, 18 (6) : 311-317.
- [94] Prewitt, J.M.S., and Mendelsohn, M.L., (1966) The analysis of cell images. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 128 : 1035-1053.
- [95] Rackley, R. R., Flenniken, A. M., Kuriyan, N. P., Kessler, P. M., Stoler, M. H., and Williams, B. R. G., (1993) Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth. Differ.*, 4 : 1023-1031.

- [96] Rajah, R., Glaser, E. M., and Hirshfield, A. N., (1992) The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev. Dynam.*, 194 : 177-192.
- [97] Raynaud, A., (1942) Recherches embryologiques et histologiques sur la différenciation sexuelle normale de la souris. In: «Suppléments au Bulletin Biologique de France et de Belgique». Paris. pp.1-43.
- [98] Raynaud, A., (1969) Les organes génitaux des mammifères. In : «Traité de Zoologie». Paris : Masson, Tome XVI, Fasc. VI, pp.149-265.
- [99] Rey, R., and Josso, N., (1997) Différenciation sexuelle : embryogenèse des organes génitaux internes et externes. In : «2^{ème} journée de médecine fœtale de Briançon », Briançon, pp. 9-60.
- [100] Ringwald, M., Baldock, R., Bard, J., Kaufman, M.H., Eppig, J.T., Richardson, J.E., Nadeau, J.H., and Davidson, D., (1994) A database for mouse development. *Science*, 265 : 2033-2034.
- [101] Roosen-Runge, E.C., and Holstein, A.F., (1978) The human rete testis. *Cell Tissue Res.*, 189 : 409-433.
- [102] Rudé, F.P., Anderson, L., Conley, D., and Gasser, R.F., (1994) Three-dimensional reconstructions of the primary palate region in normal human embryos. *Anat. Rec.*, 238 : 108-113.
- [103] Rugh, R., (1968) The mouse. Its reproduction and development. Minneapolis : Burgess Publishing Company.
- [104] Ryan, G., Steele-Perkins, V., and Morris, J. F., (1995) Repression of Pax-2 by WT-1 during normal kidney development. *Development*, 121 : 867-875.

- [105] Sainio, K., Hellstedt, P., Kreidberg, J. A., Saxen, L., and Sariola, H., (1997) Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development*, 124 : 1293-1299.
- [106] Saitoh, K., Terada, T., and Hatakeyama, S., (1990) A morphological study of the efferent ducts of the human epididymis. *Int. J. Androl.*, 13 : 369-376.
- [107] Sanchez, M. P., Silos-Santiago, I., Friséñ, J., He, B., Lira, S.A., and Barbacid, M., (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 382 : 70-73.
- [108] Saxén, L., (1987) Organogenesis of the vertebrate excretory system. In : « Organogenesis of the kidney ». Cambridge : Cambridge University Press, pp.1-34.
- [109] Schafer, A. J., and Goodfellow, P. N., (1996) Sex determination in humans. *BioEssays*, 12 : 955-963.
- [110] Shantz, M., (1981) Surface definition for branching contour-defined objects. *Comput. Graph.*, 15(2) : 242-270.
- [111] Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., and Costantini, F., and Pachnis, V., (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor *ret*. *Nature*, 367 : 380-383.
- [112] Schuchardt, A., D'Agati, V., Pachnis, V., and Costantini, F., (1996) Renal agenesis and hypodysplasia in *ret-k⁻* mutant mice results from defects in ureteric bud development. *Development*, 122 : 1919-1929.
- [113] Shikunami, J., (1926) Detailed form of the Wolffian body in human embryos of the first eight weeks. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.*, 18 : 51-61.

- [114] Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M. J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N., (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346 : 240-244.
- [115] Sjöstrand, F.S., (1974) A search for the circuitry of directional selectivity and neural adaptation through three-dimensional analysis of the outer plexiform layer of the rabbit retina. *J. Ultrastruct. Res.*, 49 : 60-156.
- [116] Sjöstrand, F.S., (1989) An elementary information processing component in the circuitry of the retina generating the on-responses. *J. Ultrastruct. Res.*, 102 : 24-38.
- [117] Stanton, B. R., Perkins, A. S., Tessarollo, L., Sassoon, D. A., and Parada, L. F., (1992) Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Gen. Dev.*, 6 : 2225-2247.
- [118] Sukhatme, V. P., Cao, X., Chang, L. L., Tsai-Morris, C. H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C. P., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T., Le Beau, M. M., and Adamson, E. D., (1998) A zinc-finger encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation and after depolarization. *Cell*, 53 : 37-43.
- [119] Suvanto, P., Hiltunen, J. O., Arumäe, U., Moshnyakov, M., Sariola, H., Sainio, K., and Saarma, M., (1996) Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic rat by *in situ* hybridization. *Eur. J. Neurosci.*, 8 : 816-822.
- [120] Theiler, K., (1972) *The House Mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age.* New York : Springer-Verlag, Stage 16-23, pp.60-112.
- [121] Torrey, T.W., (1943) The development of the urogenital system in the albino rat. I. The kidney and its ducts. *Am. J. Anat.*, 72 : 113-147.

- [122] Torrey, T.W., (1954) The developement of the human nephrons. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.*, 35 : 175-197.
- [123] Tremblay, P and Gruss, P., (1994) Pax : genes for mice and men. *Pharmac. Ther.*, 61 : 205-226.
- [124] Udupa, J.K., (1991) Computer aspects of 3D imaging in medicine: a tutorial. In : « 3D imaging in medicine ». Boston : Udupa, J.K., and Herman, G.T., CRC Press, chap. 1, pp.1-69.
- [125] Upadhyay, S., Luciani, J.M., Zamboni, L., (1979) The role of the mesonephros in the development of indifferent gonads and ovaries of the mouse. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19 (4B) : 1179-1196.
- [126] Upadhyay, S., Luciani, J.M., Zamboni, L., (1981) The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In: «Development and function of reproductive organs». Amsterdam Oxford Princeton : Byskov, A.G., Peters, H., Excerpta Medica, Int Congr Ser N°559, pp. 18-27.
- [127] Van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A., (1994) Receptor protein tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10 : 251-337.
- [128] Verbeek, F.J., Huijsmans, D.P., Baeten, R.J.A.M., Schoutsen, N.J.C., and Lamers, W.H., (1995) Design and implementation of a database and program for 3D reconstruction from serial sections: a data driven approach. *Micros. Res. Tec.*, 30 : 496-512.
- [129] Vilain, E., McElreavey, K., Herskowitz, I., and Fellous, M., (1992) La détermination du sexe : faits et nouveaux concepts. *Med. Sci.*, 8 : 1-7.

- [130] Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schempp, W., and Scherer, G., (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell*, 79 : 1111-1120.
- [131] Wang, H., (1968) The urinary system. In : « An outline of human embryology ». London : William Heinemann Medical Books Ltd, chap. 12, pp. 120-126.
- [132] Ware, R.W., and LoPresti, V., (1975) Three-dimensional reconstruction from serial sections. *Int. Rev. Cytol.*, 40 : 325-440.
- [133] Wartenberg, H., (1981a) Differentiation and development of the testes. In : « The testis ». New York: Burger, H., and de Kretser, D., Raven Press, chap.3, pp. 39-80.
- [134] Wartenberg, H., (1981b) The influence of the mesonephric blastema on gonadal development and sexual differentiation. In: «Development and function of reproductive organs ». Amsterdam : Byskov, A.G., Peters, H., Excerpta Medica, Int Congr Ser N°559, pp. 3-12.
- [135] Wartenberg, H., Kinsky, I., Viebahn, C., and Schmolke, C., (1991) Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J. Electron. Microsc. Tech.*, 19 : 133-157.
- [136] Weninger, W. J., Meng, S., Streicher, J., and Müller, G. B., (1998) A new episcopic method for rapid 3-D reconstruction : applications in anatomy and embryology. *Anat. Embryol.*, 197 : 341-348.
- [137] Wilkinson, D.G., and Green, J., (1990) *In situ* hybridization and the three-dimensional reconstruction of serial sections. In : «Postimplantation mammalian embryos-A practical approach». Oxford: Copp, A. J., and Cockroft, D. L., University Press, pp. 155-171.

- [138] Wilson, K. M., (1926) Origin and development of the rete ovarii and the rete testis in the human embryo. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.*, 17 : 69-88.
- [139] von Winiwarter, H., (1910) La constitution et l'involution du corps de Wolff et le développement du canal de Müller dans l'espèce humaine. *Arch. Biol.*, 25 : 169-267.
- [140] Witschi E., (1948) Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.*, 32 : 67-80.
- [141] Woychik, R. P., Stewart, T. A., Davis, L. G., D'Eustachio, P., and Leder, P., (1985) An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in transgenic mice. *Nature*, 318 : 36-49.
- [142] Woychik, R. P., Mass, R. L., Zeller, R., Vogt, T. F., and Leder, P., (1990) « Formins » proteins de-duced from alternative transcripts of limb deformity gene. *Nature*, 346 : 850-853.
- [143] Zamboni, L., and Upadhyay, S., (1982) The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. *Amer. J. Anat.*, 165 : 339-356.

ABRÉVIATIONS

- ADNc : Acide DéoxyriboNucléique complémentaire,
- AMH : Hormone AntiMullerienne,
- ARNm : Acide RiboNucléique méssager,
- DSI : Discrete Smooth Interpolation,
- DSS : Dosage Sensitive Sex reversal,
- EGR-1 : Early Growth Response,
- GDNF : Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor,
- GOCAD : GeOlogical Computer Aided Design,
- HMG : High Mobility Group proteins,
- IEG : ImmEDIATE-early genes,
- Krd : Kidney retinal defects,
- laboratoire ILDI : laboratoire Institut Lorrain pour le Développement de l'Image,
- laboratoire LORIA : laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications,
- Id : limb deformity,
- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus,
- Procédure GLM : General Linear Models,
- procédure TTEST : test « t » de Fisher-Student,
- SAS : Statistical Analysis System,
- Sd : Danforth's short tail,
- SF-1 : steroidogenic factor-1,
- SOX : SRY-like HMG-box,
- SRY : Sex determining Region, Y chromosome,
- système STERECON : STEreoscopic RECONstruction system,
- système NeuRef : Neuroanatomical Reference system,
- TDF : Testis Determining Factor,
- Tdy : Testis determining Y,
- WAGR : tumeur de Wilms, Aniridie, anomalies Génito-urinaires et Retard mental ,
- WT1 : Wilms' tumor,

ANNEXE

Résultats des procédures statistiques utilisées

Tableau.1: ANOVA au stade 10.5 jours embryonnaires

N.	Clas.	Typ.	Vol.		Surf.		Long.		Angl.	
			F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
39	S*P	i	0,89	0,4562	1,5	0,2312	1,42	0,2534	6,18	0,0019
	S	i	1,44	0,2381	2,74	0,1071	0,98	0,3284	0,7	0,4088
	P	i	0,61	0,547	0,88	0,4221	1,64	0,2088	8,92	0,0008
54	S*P	l	1,15	0,34	5,35	0,0028	1,45	0,2396	4,56	0,0069
	S	l	0,49	0,4893	3,52	0,0664	1,5	0,226	1,21	0,2769
	P	l	1,48	0,2385	6,26	0,0037	1,42	0,2507	6,23	0,0039
105	S*P	i+l	0,19	0,9003	0,37	0,7721	1,66	0,1795	7,3	0,0002
	S	i+l	0,51	0,4747	0,37	0,5453	1,24	0,2678	0,2	0,6581
	P	i+l	0,03	0,967	0,38	0,6873	1,88	0,1586	10,85	0,0001

Abréviations:

N.: Nombre d'individus

Clas.: Classe étudiée S (sexe), P (portée) et S*P (interaction sexe*portée)

Typ.: Type d'éléments suivis, i pour isolé ou indépendant, l pour lié au canal de wolff, et i+l pour tous les éléments tubulaires y compris les canaux de Wolff et Müller.

Vol.: volume

Surf.: surface

Long.: longueur

Angl.: angle

Tableau.2: ANOVA au stade 11.5 jours embryonnaires

N.	Clas.	Typ.	Vol.		Surf.		Long.		Angl.	
			F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
66	S*P	i	1,97	0,1271	1,05	0,3773	0,65	0,586	2,86	0,044
	S	i	2,27	0,1371	0,5	0,4801	0,91	0,343	3,81	0,0555
	P	i	1,83	0,1695	1,32	0,2742	0,52	0,5981	2,39	0,1006
52	S*P	l	2,27	0,0928	0,78	0,5123	0,94	0,4289	1,64	0,193
	S	l	6,45	0,014	1,98	0,1663	1,55	0,2194	0,01	0,9436
	P	l	0,18	0,8389	0,18	0,837	0,64	0,5342	2,45	0,0966
130	S*P	i+l	1,46	0,2286	1,03	0,3797	0,41	0,7437	0,71	0,5484
	S	i+l	4,36	0,039	1,55	0,2157	0,24	0,625	1,64	0,2028
	P	i+l	0,01	0,9896	0,78	0,4616	0,5	0,6077	0,24	0,7843

Tableau.3: ANOVA au stade 12.5 jours embryonnaires

N.	Clas.	Typ.	Vol.		Surf.		Long.		Angl.	
			F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
93	S*P	i	2,31	0,0821	1,88	0,1395	1,2	0,3157	2,77	0,047
	S	i	1,86	0,1765	0,86	0,357	0,49	0,4845	1,28	0,2615
	P	i	2,53	0,0853	2,38	0,098	1,55	0,2182	3,51	0,034
53	S*P	l	2,08	0,1156	3,31	0,028	2,04	0,1211	2,18	0,1019
	S	l	0,01	0,9318	0,69	0,4117	0,73	0,3977	1,52	0,2242
	P	l	3,11	0,0535	4,63	0,014	2,69	0,0779	2,52	0,0911
165	S*P	i+l	4,15	0,007	3,12	0,028	2,81	0,041	3,71	0,013
	S	i+l	1,41	0,2368	1,72	0,1916	0,03	0,8649	2,47	0,1182
	P	i+l	5,52	0,005	3,82	0,024	4,21	0,017	4,32	0,015

Tableau.4: ANOVA au stade 13.5 jours embryonnaires

N.	Clas.	Typ.	Vol.		Surf.		Long.		Angl.	
			F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
74	S*P	i	2,73	0,0503	1,56	0,2072	0,88	0,4561	2,71	0,0521
	S	i	5,36	0,024	1,46	0,2304	1,16	0,2854	0,29	0,5934
	P	i	1,42	0,2492	1,61	0,208	0,74	0,4811	3,93	0,025
41	S*P	l	3,27	0,032	0,86	0,4699	0,67	0,5753	2,26	0,0978
	S	l	4,67	0,0372	0,27	0,6092	1,26	0,2683	6,53	0,015
	P	l	2,56	0,0907	1,16	0,325	0,37	0,6901	0,12	0,8852
140	S*P	i+l	2,38	0,0721	2,13	0,0989	0,14	0,9364	2,42	0,0701
	S	i+l	5,08	0,026	2	0,1595	0,24	0,6264	1,19	0,277
	P	i+l	1,04	0,3573	2,2	0,1148	0,09	0,9143	3,03	0,0523

Tableau.5: ANOVA au stade 14.5 jours embryonnaires

N.	Clas.	Typ.	Vol.		Surf.		Long.		Angl.	
			F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
69	S*P	i	0,34	0,7956	0,08	0,9715	0,81	0,4924	0,68	0,5676
	S	i	0,17	0,6794	0,07	0,79	1,12	0,2944	0,25	0,6212
	P	i	0,43	0,6552	0,08	0,9216	0,66	0,5214	0,9	0,4132
39	S*P	l	1,71	0,1819	3,32	0,0308	0,69	0,5636	4,91	0,006
	S	l	2,28	0,14	5,98	0,02	0,32	0,5741	11,08	0,002
	P	l	1,43	0,2526	1,99	0,1516	0,88	0,4255	1,83	0,1764
132	S*P	i+l	0,34	0,7933	0,7	0,5559	1	0,3949	0,81	0,4889
	S	i+l	0,01	0,9139	0,37	0,5437	1,85	0,1757	1,89	0,1728
	P	i+l	0,51	0,6013	0,86	0,426	0,57	0,5646	0,28	0,7574

Tableau.6: ANOVA au stade 15.5 jours embryonnaires

N.	Clas.	Typ.	Vol.		Surf.		Long.		Angl.	
			F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
47	S*P	i	0,37	0,7734	1,11	0,3535	0,91	0,4456	1,82	0,1587
	S	i	0,36	0,552	0,1	0,7505	0,03	0,8598	0,35	0,5546
	P	i	0,38	0,6871	1,62	0,2095	1,34	0,2714	2,55	0,0903
55	S*P	l	2,64	0,0591	5,23	0,003	1,78	0,1636	5,06	0,004
	S	l	2,06	0,157	3,92	0,0531	0,27	0,6049	0	0,9745
	P	l	2,93	0,0623	5,88	0,005	2,53	0,0898	7,58	0,001
126	S*P	i+l	0,55	0,6507	1,28	0,2827	1,05	0,3714	0,99	0,3993
	S	i+l	0,01	0,9216	0,14	0,7103	0,31	0,5798	1,5	0,2244
	P	i+l	0,82	0,4444	1,86	0,1604	1,43	0,244	0,74	0,4785

Dans les tableaux 7 à 16, sont présentés :

- le nombre d'individus de deux stades embryonnaires mis en comparaison pour un type d'éléments mésonéphritiques. Par exemple, n10 = 27 au stade 10.5 jours embryonnaires et n11 = 49 au stade 11.5 jours embryonnaires, pour tous les éléments mésonéphritiques isolés chez des souris mâles (im).

- les moyennes de chacun des groupes m10 et m11 sont calculées ainsi que les valeurs F' et le niveau de significativité qui permettent de rejeter ou non l'hypothèse d'égalité des moyennes des deux groupes. Ce T TEST a été réalisé pour chacune des variables mesurées: volume (vol.), surface (surf.), longueur (long.) et angle (angl.).

Tableau.7: T Test entre le stade 10.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables volume et surface.

		nom	vol.				surf.			
n10	n11		F'	Pr>F'	m10	m11	F'	Pr>F'	m10	m11
27	49	im	1,43	0,3286	64,8	91,6	2,3	0,0249	95,9	138,2
43	43	lm	1,61	0,1272	158,2	271,3	1,33	0,3609	198,3	336,2
9	9	wm	1,32	0,7058	560,9	688,1	1,06	0,9333	829,7	973,5
12	17	if	6,95	0,0024	39,5	126,8	21,78	0	56,3	163,8
11	9	lf	15,33	0,0002	119,5	568,5	14,51	0,0003	97,6	477,6
3	3	wf	19,56	0,0973	1306,6	1076,6	2,01	0,6639	1089,5	1390,3
n10	n12		F'	Pr>F'	m10	m12	F'	Pr>F'	m10	m12
27	76	im	3,82	0,0003	64,8	93	3,03	0,0023	95,9	143,8
43	44	lm	1,53	0,1694	158,2	146,2	1,91	0,0374	198,3	244,5
9	9	wm	3,8	0,0766	560,9	459,4	1,94	0,3691	829,7	714
12	17	if	2,73	0,0971	39,5	48,8	17,67	0	56,3	110,1
11	9	lf	1	1	119,5	152,3	3,45	0,0709	97,6	173,4
3	3	wf	1,01	0,9942	1306,6	280,4	3,56	0,4389	1089,5	488,4
n10	n13	nom	F'	Pr>F'	m10	m13	F'	Pr>F'	m10	m13
27	62	im	1,35	0,4072	64,8	62,8	2,85	0,0044	95,9	123,9
43	33	lm	2,79	0,0034	158,2	101	1,57	0,1706	198,3	235,6
9	9	wm	3,94	0,0696	560,9	522,6	6,69	0,0144	829,7	634,9
12	12	if	8,05	0,0017	39,5	122,5	24,78	0	56,3	176,3
11	8	lf	1,29	0,6893	119,5	198,1	6,61	0,0084	97,6	285,8
3	3	wf	1,75	0,7261	1306,6	285,7	24,07	0,0798	1089,5	492,6
n10	n14	nom	F'	Pr>F'	m10	m14	F'	Pr>F'	m10	m14
27	54	im	2,82	0,0053	64,8	98,7	3,36	0,0013	79,5	145,6
43	27	lm	1,13	0,7146	158,2	172,4	1,5	0,2353	198,3	309,8
9	9	wm	1,53	0,5621	560,9	619,3	5,23	0,0308	829,7	880,8
12	15	if	7,1	0,0024	39,5	112,2	16,32	0	56,3	162,1
11	12	lf	7,62	0,0024	119,5	93,4	2,46	0,1553	97,6	149,4
3	3	wf	5,93	0,2885	1306,6	328,8	1,76	0,7242	1089,5	592
n10	n15	nom	F'	Pr>F'	m10	m15	F'	Pr>F'	m10	m15
27	41	im	2,07	0,0538	64,8	77	3,01	0,0041	95,9	118,5
43	41	lm	1,11	0,7476	158,2	150,7	1,88	0,0452	198,3	272,3
9	9	wm	4,13	0,0612	560,9	685,6	8,2	0,0074	829,7	842,2
12	6	if	15,22	0,0003	39,5	104,4	16,07	0,0001	56,3	137,4
11	14	lf	2,03	0,2326	119,5	80,9	1,28	0,7044	97,6	142,6
3	3	wf	10,54	0,1732	1306,6	284,6	1,14	0,9361	1089,5	468,2

Tableau.8: T Test entre le stade 10.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables longueur et angle.

		nom	long.	angl.						
n10	n11		F'	Pr>F'	m10	m11	F'	Pr>F'	m10	m11
27	49	im	39,36	0	14,8	4,8	1,6	0,2171	84	52,1
43	43	lm	1,94	0,0343	8,9	9,1	1,16	0,6321	95,8	80,8
9	9	wm	1,58	0,5301	26,8	28,1				
12	17	if	76,12	0	1,2	7,5	2,51	0,1284	91,3	74,1
11	9	lf	1,75	0,4374	2,4	3,8	1,49	0,5833	85,2	81,7
3	3	wf	1,38	0,8406	34,1	47,6				
n10	n12		F'	Pr>F'	m10	m12	F'	Pr>F'	m10	m12
27	76	im	16,55	0	14,8	6,3	1,19	0,673	84	73,9
43	44	lm	2,46	0,0042	8,9	10,9	3,1	0,0004	95,8	90,9
9	9	wm	3,74	0,08	26,8	23,2				
12	17	if	139	0	1,2	8,9	1,85	0,303	91,3	63,8
11	9	lf	2,72	0,1698	2,4	3,3	2,13	0,2973	85,2	82,9
3	3	wf	1,2	0,9083	34,1	35,9				
n10	n13	nom	F'	Pr>F'	m10	m13	F'	Pr>F'	m10	m13
27	62	im	3,16	0,0002	14,8	11,4	1,02	0,9285	84	68,2
43	33	lm	1,22	0,5329	8,9	12,4	3,11	0,0014	95,8	79,2
9	9	wm	5,3	0,0297	26,8	11				
12	12	if	4,53	0,0189	1,2	2,9	1,66	0,4194	91,3	62,9
11	8	lf	39,51	0	2,4	22,2	2,1	0,2782	85,2	104,5
3	3	wf	1345,5	0,0015	34,1	8,3				
n10	n14	nom	F'	Pr>F'	m10	m14	F'	Pr>F'	m10	m14
27	54	im	11,65	0	14,8	7,1	1,51	0,2187	84	85,9
43	27	lm	1,06	0,8931	8,9	10,4	2,53	0,0165	95,8	85,6
9	9	wm	1,42	0,6313	26,8	24,9				
12	15	if	4,11	0,0238	1,2	3,2	1,07	0,8931	91,3	82,1
11	12	lf	6,77	0,0053	2,4	7,3	5,5	0,0094	85,2	106,1
3	3	wf	1339,1	0,0015	34,1	3,2				
n10	n15	nom	F'	Pr>F'	m10	m15	F'	Pr>F'	m10	m15
27	41	im	57,61	0	14,8	5	1,07	0,8289	84	56,9
43	41	lm	8,47	0	8,9	16,8	2,07	0,0234	95,8	95,5
9	9	wm	6,58	0,0152	26,8	9,5				
12	6	if	4,9	0,0266	1,2	5,5	2,39	0,348	91,3	64
11	14	lf	23,45	0	2,4	9,7	6,31	0,0029	85,2	95,3
3	3	wf	399	0,005	34,1	5,1				

Tableau.9: T Test entre le stade 11.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables volume et surface.

			vol.				surf.			
n11	n12	nom	F'	Pr>F'	m11	m12	F'	Pr>F'	m11	m12
49	76	im	2,67	0,0004	91,6	93	1,32	0,306	138,2	143,8
43	44	lm	1,05	0,8719	271,3	146,2	1,44	0,2391	336,2	244,5
9	9	wm	2,89	0,1551	688,1	459,4	1,82	0,4143	973,5	714
17	17	if	2,55	0,0699	126,8	48,8	1,23	0,6809	163,8	110,1
9	9	lf	15,38	0,0008	568,5	152,3	4,21	0,0579	477,6	173,4
3	3	wf	19,33	0,0984	1076,6	280,4	1,77	0,7227	1390,3	488,4
n11	n13	nom	F'	Pr>F'	m11	m13	F'	Pr>F'	m11	m13
49	62	im	1,06	0,8171	91,6	62,8	1,24	0,4397	138,2	123,9
43	33	lm	4,48	0	271,3	101	1,18	0,6077	336,2	235,6
9	9	wm	2,99	0,1423	688,1	522,6	6,3	0,0175	973,5	634,9
17	12	if	1,16	0,7682	126,8	122,5	1,14	0,7913	163,8	176,3
9	8	lf	11,87	0,0039	568,5	198,1	2,19	0,3167	477,6	285,8
3	3	wf	34,31	0,0566	1076,6	285,7	48,44	0,0405	1390,3	492,6
n11	n14	nom	F'	Pr>F'	m11	m14	F'	Pr>F'	m11	m14
49	54	im	1,97	0,0182	91,6	98,7	1,46	0,1849	138,2	150,8
43	27	lm	1,43	0,3382	271,3	172,4	1,13	0,708	336,2	309,8
9	9	wm	1,16	0,8386	688,1	619,3	4,92	0,0369	973,5	880,8
17	15	if	1,02	0,959	126,8	112,2	1,33	0,5937	163,8	162,1
9	12	lf	116,84	0	568,5	93,4	35,73	0	477,6	149,4
3	3	wf	116,01	0,0171	1076,6	328,8	3,55	0,44	1390,3	592
n11	n15	nom	F'	Pr>F'	m11	m15	F'	Pr>F'	m11	m15
49	41	im	1,45	0,2214	91,6	77	1,31	0,37	138,2	118,5
43	41	lm	1,46	0,2354	271,3	150,7	1,42	0,2673	336,2	272,3
9	9	wm	3,13	0,1268	688,1	685,6	7,71	0,0091	973,5	842,2
17	6	if	2,19	0,2134	126,8	104,4	1,35	0,7884	163,8	137,4
9	14	lf	31,06	0	568,5	80,9	11,32	0,0001	477,6	142,6
3	3	wf	206,22	0,0097	1076,6	284,6	1,77	0,7213	1390,3	468,2

Tableau.10: T Test entre le stade 11.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables longueur et angle

		long.				angl.				
n11	n12	nom	F'	Pr>F'	m11	m12	F'	Pr>F'	m11	m12
49	76	im	2,38	0,0017	4,8	6,3	1,36	0,2444	52,1	73,9
43	44	lm	4,78	0	9,1	10,9	3,61	0	80,8	90,9
9	9	wm	5,93	0,0211	28,1	23,2				
17	17	if	1,83	0,2391	7,5	8,9	1,36	0,5511	74,1	63,8
9	9	lf	1,55	0,5498	3,8	3,3	1,43	0,6277	81,7	82,9
3	3	wf	1,66	0,735	47,6	35,9				
n11	n13	nom	F'	Pr>F'	m11	m13	F'	Pr>F'	m11	m13
49	62	im	12,46	0	4,8	11,4	1,62	0,0828	52,1	68,2
43	33	lm	2,38	0,0089	9,1	12,4	3,62	0,0003	80,8	79,2
9	9	wm	8,39	0,0069	28,1	11				
17	12	if	16,81	0	7,5	2,9	1,52	0,512	74,1	62,9
9	8	lf	69,31	0	3,7	31,1	3,13	0,1325	81,7	104,5
3	3	wf	975,5	0,002	47,6	8,3				
n11	n14	nom	F'	Pr>F'	m11	m14	F'	Pr>F'	m11	m14
49	54	im	3,38	0	4,8	7,1	2,41	0,0026	52,1	85,9
43	27	lm	1,83	0,0787	9,1	10,4	2,94	0,0054	80,8	85,6
9	9	wm	1,12	0,8812	28,1	24,9				
17	15	if	18,54	0	7,5	3,2	2,69	0,0801	74,1	82,1
9	12	lf	11,87	0,0017	3,8	7,3	3,69	0,0488	81,7	106,1
3	3	wf	970,81	0,0021	47,6	3,2				
n11	n15	nom	F'	Pr>F'	m11	m15	F'	Pr>F'	m11	m15
49	41	im	1,46	0,2184	4,8	5	1,71	0,0894	52,1	56,9
43	41	lm	16,44	0	9,1	16,8	2,41	0,006	80,8	95,5
9	9	wm	10,42	0,0033	28,1	9,4				
17	6	if	15,54	0,0067	7,5	5,5	6	0,0581	74,1	64
9	14	lf	41,13	0	3,8	9,7	4,23	0,0215	81,7	95,3
3	3	wf	289,21	0,0069	47,6	5,1				

Tableau.11: T Test entre le stade 12.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables volume et surface.

		vol.			surf.					
n12	n13	nom	F'	Pr>F'	m12	m13	F'	Pr>F'	m12	m13
76	62	im	2,84	0	93	62,8	1,06	0,8099	143,8	123,9
44	33	lm	4,27	0	146,2	101	1,22	0,5625	244,5	235,6
9	9	wm	1,04	0,9613	459,4	522,6	3,46	0,0986	714	634,9
7	10	mm	2,12	0,3735	369,2	333,6	1,05	0,905	539,9	561,9
17	12	if	2,95	0,0486	48,8	122,5	1,4	0,5228	110,1	176,3
9	8	lf	1,3	0,7196	152,3	198,1	1,92	0,381	173,4	285,8
3	3	wf	1,77	0,7208	280,4	285,7	85,61	0,0231	488,4	492,6
n12	n14	nom	F'	Pr>F'	m12	m14	F'	Pr>F'	m12	m14
76	54	im	1,35	0,2451	93	98,7	1,11	0,6771	143,8	150,8
44	27	lm	1,36	0,4091	146,2	172,4	1,27	0,5171	244,5	309,8
9	9	wm	2,49	0,2191	459,4	619,3	2,7	0,1812	714	880,8
7	9	mm	1,37	0,6607	369,2	264,7	2,62	0,2073	539,9	449,9
17	15	if	2,61	0,0692	48,8	112,2	1,08	0,8897	110,1	162,1
9	12	lf	7,6	0,003	152,3	93,4	8,49	0,0019	173,4	149,4
3	3	wf	6	0,2857	280,4	328,8	6,27	0,2753	488,4	592
n12	n15	nom	F'	Pr>F'	m12	m15	F'	Pr>F'	m12	m15
76	41	im	1,85	0,0357	93	77	1,01	1	143,8	118,5
44	41	lm	1,39	0,3006	146,2	150,7	1,02	0,9604	244,5	272,3
9	9	wm	1,09	0,9104	459,4	685,6	4,23	0,0569	714	842,2
7	9	mm	14,38	0,0014	369,2	124,1	11,59	0,0029	539,9	277,5
17	6	if	5,58	0,0073	48,8	104,4	1,1	1	110,1	137,4
9	14	lf	2,02	0,25	152,3	80,9	2,69	0,1094	173,4	142,6
3	3	wf	10,67	0,1714	280,4	284,6	3,13	0,4843	488,4	468,2

Tableau.12: Test T entre le stade 12.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables longueur et angle.

		long.				angl.				
n12	n13	nom	F'	Pr>F'	m12	m13	F'	Pr>F'	m12	m13
76	62	im	5,24	0	6,3	11,4	1,19	0,4932	73,9	68,2
44	33	lm	2,01	0,0424	10,9	12,4	1	1	90,9	79,2
9	9	wm	1,42	0,6347	23,2	11				
7	10	mm	4,15	0,0972	13,2	20,8				
17	12	if	30,71	0	8,9	2,9	1,12	0,8839	63,8	62,9
9	8	lf	107,39	0	3,3	22,2	4,46	0,0522	82,9	104,5
3	3	wf	1617,3	0,0012	35,9	8,3				
n12	n14	nom	F'	Pr>F'	m12	m14	F'	Pr>F'	m12	m14
76	54	im	1,42	0,1599	6,3	7,1	1,78	0,0349	73,9	85,9
44	27	lm	2,61	0,0112	10,9	10,4	1,23	0,5431	90,9	85,6
9	9	wm	5,31	0,0294	23,2	24,9				
7	9	mm	18,77	0,0005	13,2	4,8				
17	15	if	33,85	0	8,9	3,2	1,99	0,2177	63,8	82,1
9	12	lf	18,39	0,0003	3,3	7,3	2,59	0,1461	82,9	106,1
3	3	wf	1609,6	0,0012	35,9	3,2				
n12	n15	nom	F'	Pr>F'	m12	m15	F'	Pr>F'	m12	m15
76	41	im	3,48	0	6,3	5	1,26	0,4396	73,9	56,9
44	41	lm	3,44	0,0001	10,9	16,8	1,5	0,1971	90,9	95,5
9	9	wm	1,76	0,4421	23,2	9,5				
7	9	mm	2,86	0,2178	13,2	17,6				
17	6	if	28,36	0,0016	8,9	5,5	4,42	0,1087	63,8	64
9	14	lf	63,73	0	3,3	9,7	2,97	0,0796	82,9	95,3
3	3	wf	479,6	0,0042	35,9	5,1				

Tableau.13: T Test entre le stade 13.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables volume et surface.

		vol.					surf.				
n13	n14	nom	F'	Pr>F'	m13	m14	F'	Pr>F'	m13	m14	
62	54	im	2,1	0,0055	62,8	98,7	1,18	0,5363	123,9	150,8	
33	27	lm	3,14	0,0024	101	172,4	1,04	0,919	235,6	309,8	
9	9	wm	2,58	0,2023	522,6	619,3	1,28	0,7361	634,9	880,8	
10	9	mm	2,91	0,1479	333,6	264,7	2,49	0,2135	561,9	449,9	
12	15	if	1,13	0,811	122,5	112,2	1,52	0,4564	176,3	162	
8	12	lf	9,84	0,0011	198,1	93,4	16,28	0,0001	285,8	149,4	
3	3	wf	3,38	0,4565	285,7	328,8	13,66	0,1364	492,6	592	
3	3	mf	12,34	0,1499	646,6	679,3	15,31	0,1226	754,9	804,5	
n13	n15	nom	F'	Pr>F'	m13	m15	F'	Pr>F'	m13	m15	
62	41	im	1,54	0,1286	62,8	77	1,05	0,8372	123,9	118,5	
33	41	lm	3,08	0,0015	101	150,7	1,2	0,5996	235,6	272,3	
9	9	wm	1,05	0,949	522,6	685,6	1,23	0,781	634,9	842,2	
10	9	mm	30,45	0	333,6	124,1	10,99	0,0025	561,9	277,5	
12	6	if	1,89	0,3518	122,5	104,4	1,54	0,6626	176,3	137,4	
8	14	lf	2,62	0,1276	198,1	80,9	5,16	0,0108	285,8	142,6	
3	3	wf	6,01	0,2853	285,7	284,6	27,35	0,0705	492,6	468,2	
3	3	mf	1,67	0,7499	646,6	611,1	3,08	0,4901	754,9	665,7	

Tableau.14: Test T entre le stade 13.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables longueur et angle.

		long.				angl.				
n13	n14	nom	F'	Pr>F'	m13	m14	F'	Pr>F'	m13	m14
62	54	im	3,69	0	11,4	7,1	1,49	0,1566	68,2	85,9
33	27	lm	1,3	0,5001	12,4	10,4	1,23	0,5741	79,2	85,6
9	9	wm	7,52	0,0099	11	24,9				
10	9	mm	77,92	0	20,8	4,8				
12	15	if	1,1	0,8483	2,9	3,2	1,78	0,3284	62,9	82,1
8	12	lf	5,84	0,0102	22,2	7,3	11,54	0,0006	104,5	106,1
3	3	wf	1	0,9976	8,3	3,2				
3	3	mf	2,11	0,6432	7,4	5,9				
n13	n15	nom	F'	Pr>F'	m13	m15	F'	Pr>F'	m13	m15
62	41	im	18,64	0	11,4	5	1,06	0,87	68,2	56,9
33	41	lm	6,92	0	12,4	16,8	1,5	0,2407	79,2	95,5
9	9	wm	1,24	0,7665	11	9,5				
10	9	mm	1,45	0,6092	20,8	17,6				
12	6	if	1,08	0,8437	2,9	5,5	3,95	0,1424	62,9	64
8	14	lf	1,69	0,3952	22,2	9,7	13,23	0,0001	104,5	95,3
3	3	wf	3,37	0,4574	8,3	5,1				
3	3	mf	1,62	0,7627	7,4	4,5				

Tableau.15: Test T entre le stade 14.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables volume et surface.

n14	n15	nom	vol.		m14	m15	surf.		m14	m15
			F'	Pr>F'			F'	Pr>F'		
54	41	im	1,37	0,3065	98,7	77	1,12	0,7241	150,8	118,5
27	41	lm	1,02	0,937	172,4	150,7	1,25	0,5504	309,8	272,3
9	9	wm	2,7	0,1817	619,3	685,6	1,57	0,5397	880,8	842,2
9	9	mm	10,48	0,0032	264,7	124,1	4,41	0,0506	449,9	277,5
15	6	if	2,14	0,24	112,2	104,4	1,02	1	162,1	137,4
12	14	lf	3,76	0,0344	93,4	80,9	3,16	0,0642	149,4	142,6
3	3	wf	1,78	0,72	328,8	284,6	2	0,6662	592	468,2

Tableau.16: Test T entre le stade 14.5 jours embryonnaires et les ultérieurs pour les variables longueur et angle.

n14	n15	nom	long.		m14	m15	angl.		m14	m15
			F'	Pr>F'			F'	Pr>F'		
54	41	im	4,95	0	7,1	5	1,41	0,2557	85,9	56,9
27	41	lm	8,97	0	10,4	16,8	1,22	0,6096	85,6	95,5
9	9	wm	9,34	0,0048	24,9	9,5				
9	9	mm	53,61	0	4,8	17,6				
15	6	if	1,19	0,7237	3,2	5,5	2,22	0,3873	82,1	64
12	14	lf	3,47	0,0463	7,3	9,7	1,15	0,8049	106,1	95,3
3	3	wf	3,36	0,4591	3,2	5,1				

Differentiated aspect of female and male mouse mesonephroi

MARIE-DANIELLE VAZQUEZ^{1*}, PIERRE BOUCHET², BERNARD FOLIGUET¹, HUBERT GÉRARD¹,
JEAN-LAURENT MALLE³ and BRUNO LEHEUP¹

Département de Cytologie, Histologie et Embryologie, Faculté de Médecine, ²Centre de Recherche en Informatique de Nancy and ³École Nationale Supérieure de Géologie de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT In the mouse, *Sry* is expressed by somatic cells in the genital ridge and leads to initiate the transformation of the indifferent gonad into a testis. Here, we have examined the segmented female and male mesonephroi over the developmental period when the initiation of seminiferous cord formation takes place. We have generated three-dimensional models which reveal structural differences between male and female mesonephric tubules at 11.5, 13.5 and 14.5 days *post coitum*. We evaluate, following structural parameters, that form and orientation of the tubules could evolve differently in both sexes. We propose that the structural organization of the mesonephric tubules presents an early dimorphism.

KEY WORDS: *mesonephros, 3-D reconstruction, sex determination, histological sections*

There is now abundant evidence that *Sry* is the testis-determining gene on the mammalian Y chromosome (Gubbay *et al.*, 1990; Clair *et al.*, 1990). *Sry* is expressed at 10.5 and 11.5 days *post coitum* (*pc*) by somatic cells in the genital ridge, when gonads of both male and female mouse embryos are morphologically indistinguishable (Koopman *et al.*, 1990).

There are two major gonadal somatic cell lineages: the supporting cell lineage (Sertoli cells in the testis and granulosa cells in the ovary) and the steroidogenic lineage (Leydig cells in the testis and theca cells in the ovary). The Sertoli cell lineage has been shown to be critical in sex determination (Palmer and Burgoyne, 1991). It has been shown in XX/XY chimaeric mouse testes, that the Sertoli cell population is predominantly XY (Burgoyne *et al.*, 1988; Patek *et al.*, 1991). *Sry* is believed to act on the pre-Sertoli cells based on genetic analysis of XX/XY chimeras (Burgoyne and Palmer, 1993).

On the basis of histological analysis, several studies indicate that these cells may be derived in whole or in part from the mesonephros, suggesting that pre-Sertoli cells are contributed to by mesonephric tubule cells (Upadhyay *et al.*, 1981; Wartenberg, 1981; Merchant-Larios and Taketo, 1991; Wartenberg *et al.*, 1991).

In the mouse, the mesonephros appears to be the provision of some of the stromal cells (Buehr *et al.*, 1993). Moreover, the attached mesonephros is thought to be required in cord formation for the testis differentiation after 11.5 days *pc* as shown by organ culture experiments (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993).

Our present knowledge of the structural components of the mesonephros in the mouse is mostly based on the reconstruction produced by graphical methods (Bovy, 1929).

We are interested in characterizing mesonephric tubules development in the male and female mouse mesonephroi during testis organogenesis. By three-dimensional reconstruction, we have been able to examine anatomical differences of the mesonephric region. In this study, we have compared the morphological characteristics of the mesonephric tubules at three stages: 11.5, 13.5 and 14.5 days *pc* (Table. 1).

By 11.5 embryonic days, the 3-D models of mesonephroi present numerous convoluted tubules which are directly connected to the Wolffian duct (Figs. 1 and 2). In both male and female embryos, the tubules occupy the cranial two-thirds of the mesonephros. Only in female embryo, the more cranial tubule presents several connections with the Wolffian duct, when gonads of both XX and XY embryos are morphologically alike (Fig. 2).

By 13.5 embryonic days, tubules in the mesonephros appear to be degenerating and fragmented. The female mesonephric region reveals the same structural particularity than at 11.5 days *pc* (Fig. 4). This structural particularity can help us to distinguish

Abbreviations used in this paper: a, angle; *Sry*, sex determining region of Y; A, area; wd, Wolffian duct; DSI, discrete smoothing interpolation; GOCAD, geological computer aided-design; L, length; md, Müllerian duct; mt, mesonephric tubules; pc, post coitum.

Address for reprints: Département de Cytologie, Histologie et Embryologie, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. FAX: 33 (0) 3 83 59 28 83. e-mail: vasquez@loria.fr

4-6282/98/\$10.00

© BC Press
Printed in Spain

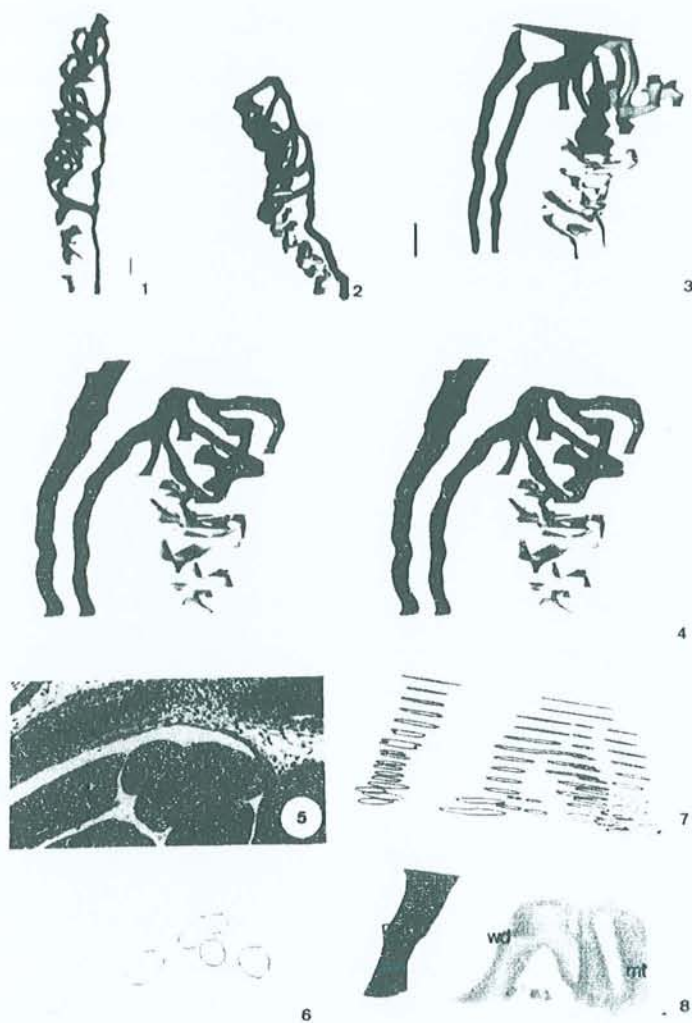


Fig. 1. The 3-D model of male mesonephric region at E11.5. Bar, 90 μ m.
 Fig. 2. The 3-D model of female mesonephric region at E11.5. Bar, 90 μ m.
 Fig. 3. The 3-D model of male mesonephric region at E13.5. Bar, 70 μ m.
 Fig. 4. Stereo view of the female mesonephric region at E13.5, viewed along a fivefold axis. Viewpoints are displaced by $\pm 3^\circ$ relative to the perceived line of sight. Bar, 70 μ m.
 Fig. 5. Histological section of a tubular zone at the level of the rostral part of the ovary.
 Fig. 6. The external contours of distinct tubules of the previous sections were manually drawn and scanned. Then, each contour line was converted into polygonal lines, as we can see here.
 Fig. 7. Serially stacked outlines of the rostral female mesonephric region at E13.5.
 Fig. 8. After gathering several contours, the surfaces were rebuilt by juxtaposition of layers of triangles. This figure shows the Müllerian duct (md) and the mesonephric tubules (mt) connected to the Wolffian duct (wd) with bifurcations.

a female mesonephros from a male one and shows that the mesonephros has a sex differentiated aspect (Figs. 4 and 3).

After rebuilding 3-D models, at each following stage E11.5, E13.5 and E14.5, four parameters have been taken on three male and three female mesonephroi. These parameters are the volume (V), the area (A) and the length (L) of each tubule; and the angle

(a) formed between the main axis of the Wolffian duct and the straight line passing through the emergence of the tubule. In the case of abortive tubule, the major axis is chosen. As indicated in Figure. 9, the values are expressed as means \pm SE. Fischer's F test by the System SAS was used to analyze statistical differences. The measurements reveal significant differences between male and female tubules ($p < 0.05$):

- at E11.5, on the volume of the connected tubules ($Pr > F = .0144$),
- at E13.5, on the area of the connected tubules ($Pr > F = .0372$) and of the abortive, isolated tubules ($Pr > F = .0236$), and on the angle of the connected tubules ($Pr > F = .0149$),
- at E14.5, on the area of the connected tubules ($Pr > F = .0196$) and on the angle of the connected tubules ($Pr > F = .0021$).

These numerical results emphasize the 3-D modeling results and show anatomical differences of the mesonephric region. Although the length of the tubules remains statistically not significant between male and female mesonephros, different forms (volume or area) of the tubule are demonstrated from E11.5 to E14.5. Only, at E13.5 and E14.5, when the gonad differentiation is complete, the orientation of the connected tubules is significantly different between male and female mesonephric region. This result suggests that the tubules which participate to the rete testis or the rete ovarii are recognized by a differentiated organization. The observations of the 3-D study at E11.5 suggest that it should be regarded probably as an early mesonephric dimorphism.

Experimental procedures

Specimens

SPF outbred mice, OF1 Ico: OF1 (IOPS Caw), (stock maintained by the Department, colony of R. Janvier, 53680 Le Genest, France) were used. The embryos were obtained from natural mating of mice. For embryo collections the time point of vaginal plug observation was designated as 0.5 days *post coitum*. (E followed by the number of the day).

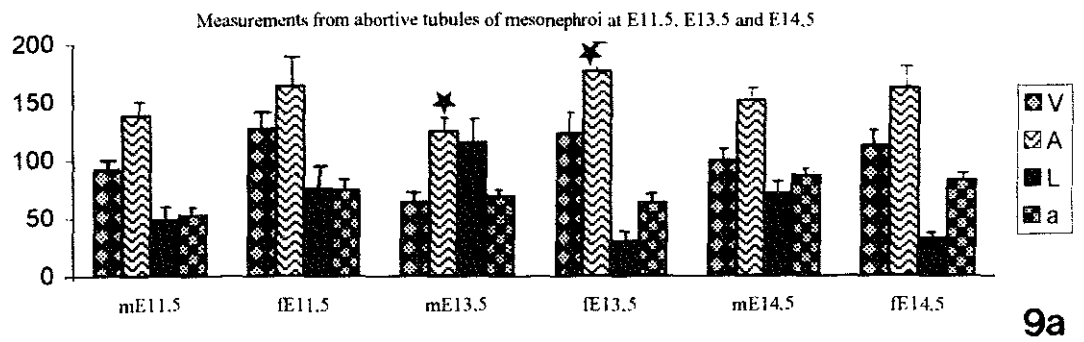
Three embryos with the same sex were collected per female in pregnancy for each stage of the development of the mesonephros. The uterine horns were dissected. Embryos enclosed within their membrane were also sexed by the chromatin test of Farias, Kajii and Gartner (1967). This test was taken up again by other authors (Jost 1972). A piece of amnion was stained with 1% acetic orcein and examined for the presence of Barr bodies in female nuclei.

For histology, the mouse embryos were fixed in Bouin's fluid for 5 to 12 h depending on age and size of embryo, transferred to graded ethanol, and finally embedded in paraffin. Embedded specimens were serially sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin.

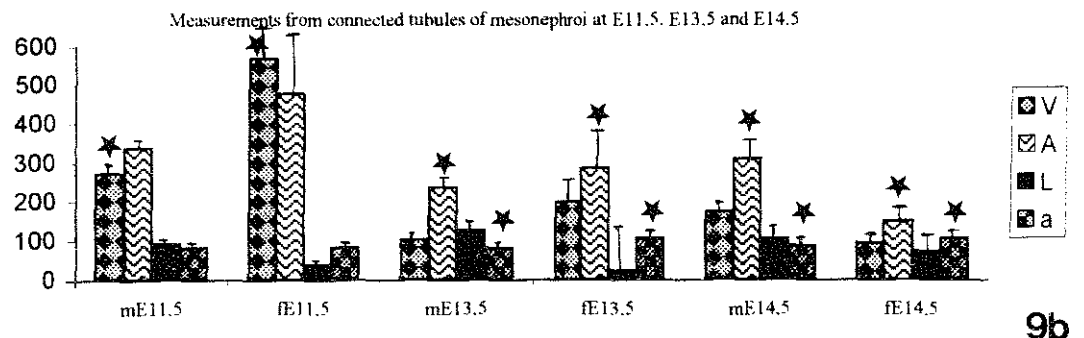
The light microscopical analysis of the prepared specimens was restricted to the rostral part of the mesonephros including mesonephric duct(s) and its tubules. Overall, each mesonephros yielded an average of 100 sections, that was performed in E11.5, E13.5 and E14.5 stages (Table 1).

Reconstruction method

As shown in Figure. 5, histological section of the mesonephric tubular zone allows to realize 3-D reconstructions. Here, from twelve successive histological sections, we have rebuilt a figure of bifurcation (Fig. 7). The external contours of distinct tubules were manually drawn and scanned. Then, each contour line was converted into polygonal line (Fig. 6). The surfaces are rebuilt thanks to the GOCAD (GeOlogical Computer Aided-Design) software. They were defined by juxtaposition of layers of triangles whose vertices are elements of the different polygonal lines obtained previously. An advantage of the use GOCAD software is based on the



9a



9b

g. 9. Measurements on abortive tubules (a) and connected tubules to the Wolffian duct (b) at E11.5, E13.5 and E14.5. (V, volume x 10³ mm³; A, area x 10² mm²; L, length x 10² mm; a, angle in degree; m, male; f, female).

discrete Smoothing Interpolation (DSI) method (Mallet, 1992). This efficient method permits the reduction of small irregularities of microtomy as shown in Figure. 8. It computes the x, y and z coordinates of the free vertices, and produces an adjusted smoothing by a spatial redistribution of the free vertices of the triangles.

Once the various parts of the mesonephros are reconstructed, several parameters were measured with GOCAD program.

The reconstructed surfaces have been gathered for recreating the different parts of the mesonephros.

Statistical Analysis

The values were expressed as means ± SE (Standard Error). The comparison of variance was used to analyze statistical differences (significantly different with Fischer's F test).

Acknowledgments

We are grateful to Dr. S. Magre (Laboratoire de Physiologie de la Reproduction, Université Pierre et Marie Curie, Paris) for valuable discussions and precious advices in dissection. We thank especially B. Cunin and M. Simonetti for their technical contribution in the work. We also thank P. Etienne, A. Filbois, T. Gartiser and L. Pierron for their computer assistance.

References

BOVY, J. (1929). Recherches sur le corps de Wolff et l'origine des connexions urogénitales chez la souris. *Arch. Biol.* 39: 139-174.
 BUEHR, M. SUBIN, G.U. and MCLAREN, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273-281.

TABLE 1

THE MAJOR CHARACTERISTICS OF MESONEPHROI AT E11.5, E13.5 AND E14.5.

	Major characteristics											
	E11.5 (A and B)		E13.5 (C and D)			E14.5 (E and F)						
sex	nmtb	nmtu	ns	sa	nmtb	nmtu	ns	sa	nmtb	nmtu	ns	sa
male	6	2	175	3b	3	3	69	1ic	2	7	84	1b
male	7	6	134	3b	3	4	71	2b	5	4	99	-
male	5	6	91	-	4	5	72	1ic	4	5	96	-
female	2	5	115	1sc	4	5	78	2ic	7	5	114	-
female	1	10	147	1sc	2	3	63	1sc	5	3	116	-
female	6	2	140	-	2	4	85	1sc	2	5	116	-

Abbreviations:

E11.5 (A and B): litter A for male and litter B for female mesonephroi at 11.5 embryonic days, E13.5 (C and D): litter C for male and litter D for female mesonephroi at 13.5 embryonic days, E14.5 (E and F): litter E for male and litter F for female mesonephroi at 14.5 embryonic days, nmtb: number of mesonephric tubules bound or connected to the Wolffian duct, nmtu: number of mesonephric tubules unbound to the Wolffian duct, lonely or abortive, ns: number of sections, sa: structural aspect, sc: tubule with several connections to the wolffian duct, b: tubule with a branching, ic: tubule with an incomplete second connection.

- BURGOYNE, P.S. and PALMER, S. (1993). Cellular basis of sex determination and sex reversal in Mammals. In *Gonadal development and function*. New York: Raven Press.
- BURGOYNE, P.S. BUEHR, M. KOOPMAN, P. ROSSANT, J. and MCLAREN, A. (1988). Cell autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX/XY chimaeric mouse testes. *Development* 102: 443-450.
- FARIAS, E. KAJIL, T. and GARDNER, L.I. (1967). Technique for investigation of sex chromatin in amniotic membrane of rat fetuses. *Nature* 214: 499-500.
- GUBBAY, J. COLLIGNON, J. and KOOPMAN, P. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
- JOST, A. (1972). Données préliminaires sur les stades initiaux de la différenciation du testicule chez le rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 61: 415-438.
- MALLET, J.L. (1992). Discrete smooth interpolation in geometric modelling. *Comput. Aided. Des.* 24: 178-191.
- MERCHANT-LARIOS, H. and TAKETO, T. (1991). Testicular differentiation in Mammals under normal and experimental conditions. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19: 158-171.
- MERCHANT-LARIOS, H. MORENO-MENDOZA, N. and BUEHR, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.
- KOOPMAN, P. MUNSTERBERG, A. CAPEL, B. VIVIAN, N. and LOVELL-BADGE, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-452.
- PALMER, S. and BURGOYNE, P. (1991). *In situ* analysis of fetal prepuberal and adult XX-XY chimeric mouse testis: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112: 265-268.
- PATEK, C.E., KERR, J.B., GOSDEN, R.G., JONES, K.W., HARDY, K., MUGGLETON-HARRIS, A.L., HANDYSIDE, A.H., WHITTINGHAM, D.G. and HOOPER, M.L. (1991). Sex chimaerism fertility and sex determination in the mouse. *Development* 113: 311-325.
- SINCLAIR, A.H. BERTA, P. PALMER, M.S. HAWKINS, J.R. GRIFFITHS, B.L. SMITH, M., FOSTER, J.W. FRISCHAUF, A.M. LOVELL-BADGE, R. and GOODFELLOW, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- UPADAHYAY, S. LUCIANI, J.M. and ZAMBONI, L. (1981). The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In *Development and function of reproductive organs*. (Eds A.G. Byskov., H. Peters.) Int Congr Ser N°559. Excerpta Medica, Amsterdam Oxford Princeton, pp. 18-27.
- WARTENBERG, H. (1981). Differentiation and development of the testes. In *The Testis Comprehensive endocrinology*. (Eds. H. Burger., D. de Kretser). New York: Raven Press, pp. 39-80.
- WARTENBERG, H. KINSKY, I. VIEBAHN, C. and SCHMOLKE, C. (1991). Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19: 133-157.

Received: August 1997

Accepted for publication: October 1997

3D Reconstruction of the Mouse's Mesonephros

M.-D. Vazquez^{1,*}, P. Bouchet², J.-L. Mallet³, B. Foliguet¹, H. Gérard¹ and B. LeHeup¹

Addresses of Authors: ¹Département de Cytologie, Histologie et Embryologie, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel: 33 3 83 59 28 45; Fax: 33 3 83 59 28 83; e.mail: leheup@facmed.u-nancy.fr. ²Centre de Recherche en Informatique de Nancy, Campus Scientifique-Bâtiment LORIA, 615 rue du Jardin Botanique BP239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France. e.mail: bouchet@loria.fr. ³École Nationale Supérieure de Géologie de Nancy, rue du Doyen Marcel Roubault, BP40, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy, France. e.mail: mallet@eng.u-nancy.fr. *Corresponding author.

With 15 figures

Received for publication May, 1997

Summary

The present work reports on the three-dimensional reconstruction of the segmented mesonephros during the embryonic development of the mouse. With a light microscope and an automatic reconstruction of surfaces, aspects of the mesonephros are described. These surfaces are obtained by using digitized contour lines. A new interpolation method called DSI (Discrete Smooth Interpolation) enables correction of the distortion induced by microtomy in paraffin sections. After a triangulation step, this method uses a smoothing algorithm, which implies a spatial redistribution of the vertices of the triangles to correct the rotational and translational misalignment. The use of this 3D program improves the understanding of the development patterns and helps us to appreciate changes in the rebuilt mesonephros. By 10.5 embryonic days, tubules emerge from the Wolffian body and begin their formation, then between 11.5 and 13.5 embryonic days, tortuous mesonephric tubules bound to the Wolffian duct form small curls, which grow and finally unwind. At the same time, mesonephric tubules unbound to the Wolffian duct appear, and on 13.5 embryonic days, the Müllerian duct is visible. After 14.5 embryonic days, the segmented mesonephros keeps its general aspect but decreases in size. At this time, each gonad is provided with both Wolffian and Müllerian ducts. Later, the Wolffian duct differentiates into the definitive male duct system, whilst the Müllerian duct regresses. Conversely, the paramesonephric duct differentiates into the definitive female duct system, whilst the mesonephric duct in turn degenerates. By this time degeneration has begun in the cranial portion of the mesonephros and this process progresses caudally. The spatial organization of the mesonephric tubules and the precise organization of all connections between these elements and the ducts may be well defined. Such approach can allow for a high definition of the normal pattern of mesonephros differentiation.

Introduction

The mammalian urogenital ridges emerge from the intermediate mesoderm which differentiates into nephrogenic cords visible in the cranial region of the embryo at the 8th day of embryonic life (E8.0) (Rugh, 1968; Theiler, 1972). Then, at E10.0 the urogenital ridges extend to the caudal region of the embryo. At E11.5, each mesonephros is segmented in nephric units, then, at E12.5, the transient mesonephric tubules separate in a forming part and a degenerating part. At E13.5, only a few meso-

nephric tubules of the rostral parts remain and contribute to the formation of the efferent ducts in the male. These ducts open into the adjacent part of the Wolffian duct which become the epididymis. In small mammals such as the mouse, mesonephrogenic cells in male form a 'rete blastema' constituting the canalicular system of the rete testis (Wartenberg, 1981). In the female, from E13.5, the Müllerian duct is more highly developed than the Wolffian duct. Then, the Müllerian duct becomes the oviduct. Near the ovary, the mesonephros gave remnants associated with the Wolffian body. The whole mesonephric tissue in female gives an area of degenerating mesonephros and regressing Wolffian duct, which explains the absence of rete ovarii. From E14.5, the mesonephros degenerates and disappears as an excretory organ. Some of its tubules and its ducts persist to form part of the male reproductive system. A few primitive embryonic remains persist in the female. Of the numerous morphological studies of rete testis, the efferent ducts and epididymal duct have been reported, few are dealing with three-dimensional reconstruction of these parts. This fact is likely in keeping with the highly convoluted pattern of these elements. Three-dimensional reconstruction of the intra- and paratesticular pathways is described in the hamster, including efferent ducts, rete testis, and rectus ductules (Cavicchia and Burgos, 1976). Furthermore, Saitoh et al. (1990) have established an image of the three-dimensional structure of the junction between the human rete testis and an efferent duct, and additionally between an efferent duct and an epididymal duct. For this work, a computerized image analyser is used, and the final reconstruction is produced by preparing complete serial sections of the human epididymis. A higher level of three-dimensional reconstruction is realized on parts of human embryo such as a heart at 7.4 mm length (Gérard et al., 1992) and an inner ear at stage 21 (Gérard et al., 1993) by using the GOCAD (Geological Computer-Aided Design) software which solves different problems like multiple junction and misalignment induced by distortion. With the same approach, maxillo-mandibular structures are reconstructed by using a three-dimensional modelling (Molé et al., 1995). In such fields as embryology and odontology, the common points are to improve the perception of complex shapes and to get measurements around the structure studied. In this context, to improve the understanding of the spatial evolution of the mesonephros during its development, a series of three-dimensional models of mouse mesonephros between E10.5 and E15.5 were constructed. The aim of this study is to show the structural

evolution of mesonephrotic tubules and ducts. Attention has been concentrated upon the development of the tubules which bud from the Wolffian duct, then are highly convoluted, and extend into the gonad.

Materials and Methods

Histological analysis of embryos

Embryos were obtained from natural mating of mice. For embryo collections, timed pregnancies were employed by using the vaginal plug method, with the day of plug discovery as day 0.5, and embryonic stages are listed as days post coitum (E followed by the number of day). Three embryos per female in pregnancy were collected for each stage of the mesonephros development. Embryos were dissected free of the uterine muscle and decidua, which were discarded. For sexing embryos, amnion was withdrawn and stained with orcein (Jost, 1972; Hogan et al., 1994). The presence or absence of sex chromatin in amniotic cells was, therefore, determined in order to distinguish female from male embryos. Female nuclei had a darkly stained spot, revealing inactive X heterochromatin. From E11.5, we based the diagnostic of a testis with a circumferential artery, absent in the ovary. In addition to that, using a light microscope, the sex distinction could be made from E13.5, where the testis showed the formation of primitive sex cords in the stroma and the differentiation of what would ultimately become the tunica albuginea. The ovary retained a more undifferentiated appearance but the supporting cells of the stroma had begun to stratify around the gonocytes. For histology, the mouse embryos were fixed in Bouin fluid for 5 to 12 h depending on age and size of embryo, transferred to graded ethanol, and finally embedded in paraffin (Paraplast Plus). Embedded specimens were serially sectioned at 5 μ m in either coronal or transverse planes, and stained with hematoxylin and eosin. Every section was viewed with a projecting microscope (Carl Zeiss) at the adapted magnification. The external contours of mesonephric tubules, Wolffian duct and Müllerian duct were manually drawn on paper. In total, each mesonephros yielded an average of 100 sections, that was performed in E10.5, E11.5, E12.5, E13.5, E14.5 and E15.5. The analysis was restricted to the rostral part of the mesonephros including mesonephric duct with its tubules.

Image analysis of embryos

The outlines of the mesonephrotic images were scanned, then converted into digitized points. Three-dimensional reconstructions were made by using the GOCAD (Geological Computer-Aided Design) software. The model was obtained by introducing outlines, from which surfaces were rebuilt. Once these surfaces were aligned, they were gathered into a tubule surface. This global surface was constructed by using the triangulation algorithm. Each duct was given a specific colour: black for Wolffian and Müllerian duct, dark grey for mesonephric bound tubules and light grey for mesonephric unbound tubules. However, the presence of microtomy induced distortion in paraffin sections which was a significant hindrance (Jones et al., 1994) to the accurate alignment of sections with the first generation program. The ultimate version improved the quality of the resulting model by smoothing procedure using DSI (Discrete Smooth Interpolation) method (Mallet, 1992). This process corrected the microtomy artefact. It also enable to reduce the running time. This made it possible to take screen shots of objects which can be manipulated. The reconstruction

structure can be rotated, magnified with CAD (Computer-Aided Design) tools, which contributes to a better representation.

Results

Reconstruction from serial sections of mesonephrotic tubules with a computerized three-dimensional image analyser

For each day of development of the mesonephros, three male and three female embryos are examined and reconstructed.

By E10.5, the mesonephros looks like a shapeless mass near the genital ridge which begins to form 1 to 7 tubules in male, and 3 to 4 in female embryos. It measures about 0.1 mm. The number of unbound tubules shows a greater variability (0 to 4) in male and (1 to 6) in female mesonephros (Fig. 1a,b). The number of unbound tubules in female mesonephros is larger than in E10.5 male mesonephros.

By E11.5, the mesonephros consists of nephric units and Wolffian duct. Some mesonephric tubules which seem to be spun into a ball, are bound with the Wolffian duct but other tubules are isolated. The length of the mesonephros is about 0.7 mm. This structure spreads out along the gonad. At the cranial part, 5 to 7 (for male) and 1 to 6 (for female) mesonephrotic tubules are bound whereas at the caudal part, 2 to 6 (for male) and 2 to 10 (for female) mesonephrotic tubules are unbound. The cranial mesonephric tubules are mostly more convoluted than the caudal tubules in accordance with the observations of Smith and Mackay (1991). The first tubule bound to the Wolffian duct is most often the highest convoluted. Particular to the female, it appears as a network of tubules bound to the Wolffian duct (Fig. 2a).

By E12.5, the elements connected to the Wolffian duct form curls with different sizes. At this day of development, the male mesonephros (about 0.6 mm) is more extended than the female mesonephros (about 0.4 mm). The bound tubules are concentrated in a more cranial situation (3 to 6 in male and 2 to 4 in female). Conversely, the unbound tubules, which are more in female (2 to 10) than in male (1 to 6), are spreading along the Wolffian duct (Fig. 3a,b).

From E13.5 to E15.5, the length of the mesonephros is close to 0.4 mm, and the number of bound tubules increases to 4 to 6 in male mesonephroi and 4 to 5 in female mesonephroi. For both E13.5 and E14.5, there are approximately five unbound tubules, and then, in E15.5, it decreases below 3 tubules (Figs. 4, 5, 5a,b).

By E13.5, the Müllerian duct appears along the Wolffian duct. These two ducts present the same appearance in size. The mesonephric tubules (future rete testis) which are connected to the Wolffian duct (future epididymis) change their aspect and their orientation. At the beginning the mesonephric tubules are oriented dorso-ventrally and they modify their orientation along the rostral-caudal axis. In female mesonephroi, tubules form a network structure bound to the Wolffian duct. At the last stage of development of the male mesonephroi, from E14.5 to E15.5, the Wolffian duct becomes thicker than the Müllerian duct. Moreover, the Müllerian duct shortens at this cranial part. Conversely, in the female, the Müllerian duct begins to be wider than the Wolffian duct which presents a regression processus in the cranial part too.

Manipulation of the reconstructed objects

CAD tools of the GOCAD software allow for free rotation along the axial and transversal axis to appreciate a three-dimen-

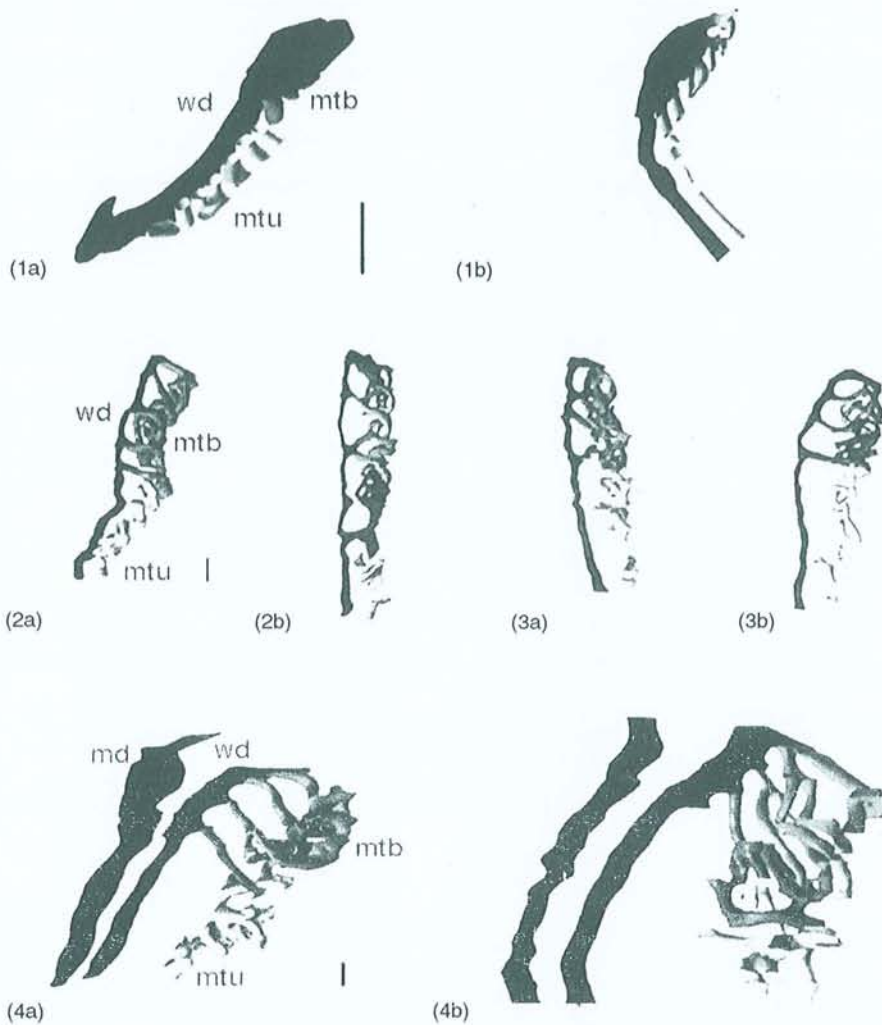


Fig. 1-4. Mouse mesonephros development from E10.5 to E13.5. At each stage, one female (a) and one male (b) mesonephroi are figured out. At E10.5 (1a,b), mesonephrotic tubules bound (mtb) to the Wolffian duct (wd) begin to emerge, and other tubules appear unbound (mtu). Stages E11.5 and E12.5 corresponds to 2a,b, and 3a,b. At E13.5 (4a,b), the Müllerian duct (md) is visible in black. All mesonephroi are presented viewed sideways from the left and cranially from the top. Bar: (1a,b, 4a,b) 30 μm ; (2a,b, 3a,b) 90 μm .

sional modelling of the mesonephros and offer free rotation along the rostro-caudal and transversal axis. This allows for full evolution of the superimposed structures (Figs 6b,c,d,e).

Discussion

The mesonephros develops by forming tubules at E10.5. Unbound tubules to a main duct which is the Wolffian duct appear numerous, small and spread along the Wolffian duct. Primarily, bound tubules look like small balls, then they unwind, extend and start to stretch from the cranial tip of the gonad. Such a description has been reported by other authors (Smith and Mackay, 1991). The majority of the tubules spread and terminate very near to the lateral edge of the gonad. In our study, 4 to 6 bound mesonephric tubules are observed to contribute to the junction between efferent ducts and the rete testis. Previous data reported that there are 5 to 6 efferent ducts in rat (Dym, 1976; Lewis-Jones et al., 1982) and 8 efferent ducts in the hamster (Cavicchia and Burgos, 1976). The number of the efferent ducts depends on the species of mammals, on the strain, on the colony and on the individual. In man, histological observations have counted 8 to 15 efferent ducts (Stieve, 1930

cited in Saitoh et al., 1990), then by a serial histological study, 6 efferent ducts were found (Jonté and Holstein, 1987). Afterwards, by a computer-aided 3D reconstruction from serial histological sections in human, 5 to 6 efferent ducts were rebuilt (Saitoh et al., 1990). By E13.5, in male embryos, the paramesonephric duct progressively shows signs of a cranial regression in agreement with Gondos (1980), while the mesonephric duct is thickening. Little by little, the bound tubules unwind until they keep the aspect of a simple tubule; they seem to lose a distal part during the unwinding associated to their degeneration (Theiler, 1972). The Müllerian duct is now present, lateral to the Wolffian duct. The latter regresses at the cranial part highly beyond E14.5. The cranial mesonephric tubules present the same mechanism of unwinding associated with a probable sign of degeneration. Rostrally, in female E13.5, mesonephric tubules have a network structure associated with the Wolffian duct. Then, at E14.5, and at E15.5, they are forming basic tubules, short, thick and without convolution whose aspect shows an apparent modification. This description of the mouse mesonephros development has been realized by a modelling method which provides an excellent representation

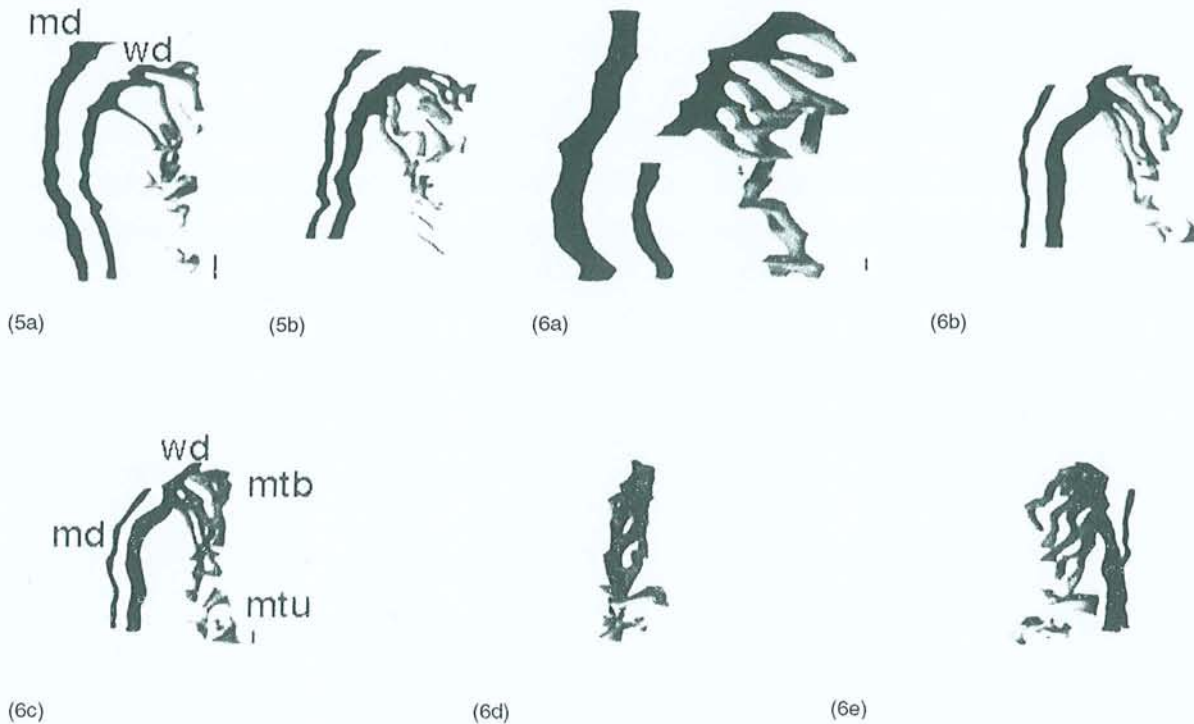


Fig. 5–6. Mouse mesonephros at E14.5 (5a,b) and at E15.5 (6a,b). In female mesonephros (a), the Müllerian duct (md) appears thicker than the Wolffian duct (wd), which seems to regress. Conversely, for male mesonephros (b) the Wolffian duct is wider than the Müllerian duct. All mesonephroi are oriented sideways from the left and cranially from the top. The same mouse mesonephros is also analysed under 4 different sides of view by 0°, 45°, 90° and 135° (6b,c,d,e). Bar: (5a,b) 50 μ m; (6a,b,c,d,e) 25 μ m.

of the mesonephros. The report of Saitoh et al. (1990) relates a three-dimensional reconstruction of a junction between a part of the rete testis and an efferent duct, and between an efferent duct and an epididymal duct. These two reconstructions have been realized by drawing the outlines of serial histological sections with a digitizer tablet. With an analogous system, the link between the metanephric mesenchyme and the metanephric and the mesonephric ducts at E12.5 in mice manifesting the limb deformity mutation has been reconstructed (Maas et al., 1994). These last two works present the advantage of a greater precision than the diagrammatic representation of a three-dimensional reconstruction of the intratesticular seminal pathway in the hamster (Cavicchia and Burgos, 1976). In comparison with these reconstructed junctions or pathways, an improved visualization of objects modelled in 3D such as the human heart embryo (Gérard et al., 1992) or a maxillo-mandibular structure (Molé et al., 1995) offer an excellent quality of visualization lacking in all previous works accomplished. This improvement was made possible by the use of a powerful tool (DSI) which smoothed the irregularities in the alignment. A large number of artifacts in the reconstruction process can make the resulting reconstruction imprecise like distortion during tissue processing due to osmolarity differences, compression during sectioning, thermal expansion due to heating during the spreading of the section. The DSI tool is reviewed as ameliorating microscopic effects, because it recalculates a probable x, y and z distribution of each triangle vertex in the outlines which allows a perfectly continuous shading. The computer process used brings many advantages in conceiving the structure. What is remarkable is the resolution of complex connections like 'y' or 'm' shapes, that have a lot of variability. In addition, the computer generates a model of a small structure (0.1 to 0.7 mm). The three-dimen-

sional reconstruction of the developing mesonephros can provide a quantitative and accurate appreciation of spatial relations between the different elements and they allow for precise analysis of small effect mutations.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. S. Magre (Laboratoire de Physiologie de la Reproduction, Université Pierre et Marie Curie, Paris) for valuable discussions and precious advices in dissection. We thank especially B. Cunin and M. Simonetti for their technical contribution in the work. We also thank P. Etienne, A. Filbois, T. Gartiser and L. Pierron for their computer assistance.

References

- Cavicchia, J. C. and M. H. Burgos, 1976: Tridimensional reconstruction and histology of intratesticular seminal pathway in the hamster *Anat. Rec.* **187**, 1–10.
- Dym, M. 1976: The mammalian rete testis—A morphological examination. *Anat. Rec.* **186**, 493–524.
- Gérard, H., P. Bouchet, P. Jacquemin, P. Le Melinaire and J. L. Mallet, 1992: A new method for computer aided-3D reconstruction of the human embryo from serial, non consecutive, histologic sections. *Acta Stereol.* [suppl 1] **11**, 187–192.
- Gérard, H., J. C. André and J. L. Mallet, 1993: Computer-aided 3D-reconstructions from routine histologic sections. *Eur. Microsc. Anal.* **1**, 23–25.
- Gondos, B. 1980: Development and differentiation of the testis and male reproductive tract. In: A. Steinberger and E. Steinberger (eds) *Testicular Development, Structure, and Function*. New York: Raven Press. pp. 3–20.
- Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini and E. Lacy, 1994: *Manipulating the Mouse Embryo, A laboratory manual*. Laboratory Press: Cold Spring Harbor. pp. 384.

- Jost, A. 1972: Données préliminaires sur les stades initiaux de la différenciation du testicule chez le rat. *Arch. Anat. microsc. Morph. exper.* **61**, 415-438.
- Jones, A. S., B. K. Milthorpe and C. R. Howlett, 1994: Measurement of microtomy induced section distortion and its correction for 3-dimensional histological reconstructions. *Cytometry* **15**, 95-105.
- Jonté, G. and A. Holstein, 1987: On the morphology of the transitional zones from the rete testis into the ductuli efferentes and from the ductuli efferentes into the ductus epididymis. Investigation on the human testis and epididymis. *Andrologia* **19**, 398-412.
- Lewis-Jones, D., R. Harrison and E. Macmillan, 1982: A re-examination of rat ductuli efferentes. *Anat. Rec.* **203**, 461-462.
- Maas, R., S. Elfering, T. Glaser and L. Jepeal, 1994: Deficient outgrowth of the ureteric bud underlies the renal agenesis phenotype in mice manifesting the *limb deformity* (*ld*) mutation. *Dev. Dynamics*, **199**, 214-228.
- Mallet, J. L., 1992: Discrete smooth interpolation in geometric modelling. *Comput. Aided. Des.* **24**, 178-191.
- Molé, C., H. Gérard, J. L. Mallet, J. F. Chassagne and N. Miller, 1995: A new three-dimensional treatment algorithm for complex surfaces: Applications in surgery. *I. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **53**, **2**, 158-162.
- Rugh, R. 1968: Its reproduction and development. The mouse. Minneapolis: Burgess Publishing Company. pp. 1-315.
- Saitoh, K., T. Terada and S. Hatakeyama, 1990: A morphological study of the efferent ducts of the human epididymis. *Int. J. Androl.* **13**, 369-376.
- Smith, C. and S. Mackay, 1991: Morphological development and fate of the mouse mesonephros. *J. Anat.* **174**, 171-184.
- Stieve, H. 1930: Harn- und Geschlechtsapparat. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Berlin: Springer, Bd. VII/2. pp. 1-339.
- Theiler, K. 1992: Development and normal stages from fertilization to four weeks of age. The House Mouse. New York: Springer-Verlag. pp. 1-151.
- Wartenberg, H., 1981: Differentiation and Development of the Testes. The Testis. New York: Raven Press. pp. 39-80.





Nom : VAZQUEZ
Prénom : Marie-Danielle

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en BIOLOGIE ET SANTÉ
Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 7 juin 1999 n°208

Le Président de l'Université



Nom et Prénom : VAZQUEZ Marie-Danielle

SUJET DE LA THESE : Apport de la reconstruction du mésonéphros segmenté dans l'étude des connexions uro-génitales chez l'Homme et la Souris.

THESE : Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

RESUME : L'étude menée est basée sur l'utilisation de coupes sériées histologiques et du logiciel GOCAD (GeOlogical Computer Aided-Design) qui génère des reconstructions 3D de mésonéphros. La première partie porte sur 3 mésonéphros humains de 4, 6 et 7 semaines d'âges. Leur reconstruction 3D apporte un ensemble d'informations sur l'organisation, la forme et la taille des tubules. La seconde partie met en évidence le développement des mésonéphros d'embryons murins de 10,5 à 15,5 jours. Les résultats des reconstructions permettent de décrire un aspect réticulé précoce des mésonéphros d'embryons femelles et d'identifier un nombre fixe de tubules mésonéphritiques liés au canal de Wolff et d'obtenir des données quantitatives sur la morphologie des tubules. Ces derniers ont probablement une origine wolffienne. Parmi les tubules isolés, les plus rostraux proviendraient des tubules liés voisins. De plus, les tubules les plus rostraux et liés au canal de Wolff paraissent participer à la formation du rete testis ou rete ovarii. Les reconstructions 3D obtenus sur l'organisation des tubules mésonéphritiques permettent non seulement d'envisager des expériences ciblées des mécanismes cellulaires, mais aussi peuvent servir de référence pour l'étude de cas pathologiques. Enfin, la technique utilisée est applicable à d'autres zones embryologiques.

MOTS-CLES : Mésonéphros, Reconstruction tridimensionnelle, Embryologie, Détermination sexuelle.

ABSTRACT : The study is based on serially histological sections. The software GOCAD (GeOlogical Computer Aided-Design) can generate mesonephroi 3D reconstructions. The first part deals with 3 human mesonephroi at 4, 6 and 7 weeks old. The 3D reconstructions bring out a set of informations on the organization, the shape and the size of the mesonephritic tubules. The second part shows the mouse mesonephros development between 10,5 and 15,5 embryonic days. The obtained results allow to describe a network aspect of the female mesonephroi and to identify a fixed number of mesonephric tubules bound to the Wolffian duct and to obtain morphological data of the mesonephric tubules. The latter have probably a wolffian origin. Among the unbound tubules, the more rostral ones should come from the next bound tubules. In addition, the more rostral bound mesonephric tubules seem to contribute to the rete testis or ovarii formation. Moreover, the obtained reconstructions allow not only to consider applications on cellular mechanisms, but also can be referenced for the study of pathologic cases. The method can be used on other embryonic sites.

KEYWORDS : Mesonephros, 3D reconstruction, Embryology, Sex determination.