

Le problème de la sécrétion de testostérone par le testicule embryonnaire de Poulet : nouvelles recherches

J.-P. WENIGER, J. CHOURAQUI, A. ZEIS

Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie expérimentale,
Université Louis-Pasteur,
12, rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France.

Summary. *The problem of testosterone secretion by the chick embryo testis : further studies.*

The aim of this study was to determine whether the chick embryo testis was able to convert dehydroepiandrosterone and androstenedione into testosterone.

Testes from 17-19 day old chick embryos were cultured *in vitro* in the presence of tritiated dehydroepiandrosterone or androstenedione of high specific activity, and the radioactive testosterone formed was isolated by thin-layer chromatography and identified by recrystallization to constant specific activity.

Parallel experiments with mouse embryo testes showed that these methods were valid. However, since specific activity with chick embryo testes was very low and could not be brought to constancy, testosterone could not be identified with these testes.

It is concluded that the 17-19 day old chick embryo testis cannot form testosterone from either dehydroepiandrosterone or androstenedione. This conclusion is in keeping with the absence of a physiological role for testosterone in the male chick embryo.

Introduction.

Depuis 1966, la réalité de la sécrétion de testostérone par le testicule embryonnaire d'Oiseau a été affirmée dans de nombreux travaux. Parmi les plus récents, nous citerons ceux de Guichard *et al.* (1979) et de Woods *et al.* (1983) sur l'embryon de Poulet et d'Ottinger et Bakst (1981), de Scheib *et al.* (1981) et de Guichard *et al.* (1983) sur l'embryon de Caille.

Pourtant, dès 1969, l'un de nous (Weniger, 1969 et 1970) avait signalé l'impossibilité de démontrer la formation de testostérone par le testicule embryonnaire de Poulet, s'opposant ainsi à Haffen et Cédard (1968). Les travaux ultérieurs consacrèrent le désaccord entre les deux groupes d'auteurs (Cédard *et al.*, 1970 ; Guichard *et al.*, 1973 ; Weniger et Zeis, 1973, 1976 et 1977). Mais il est vrai que l'utilisation de précurseurs marqués au ¹⁴C, d'activité spécifique relativement faible, n'était pas particulièrement propice à la détection de faibles quantités de tes-

tostérone. Aussi, pouvait-on envisager de reprendre ces recherches en utilisant des précurseurs tritiés, d'une activité spécifique 1 000 fois supérieure à celle des molécules marquées au ^{14}C utilisées antérieurement. Ce projet s'est imposé à nous après la publication des travaux de Guichard *et al.* (1979) et de Woods *et al.* (1983) dont il convient maintenant de dire un mot.

Le travail de Woods *et al.* (1983) concerne le dosage radioimmunologique de la testostérone dans le plasma d'embryons de Poulet mâles de 7 à 21 jours. Comparées à celles d'un travail antérieur du même laboratoire (Woods *et al.*, 1975), les valeurs de la testostéronémie trouvées par Woods *et al.* (1983) sont nettement plus élevées entre les stades de 11 et 17 jours. De plus, si Woods *et al.* (1975) avaient trouvé des différences selon le sexe, la testostéronémie étant systématiquement plus faible dans le sexe femelle, celles-ci n'ont pas été confirmées par Gasc et Thibier (1979), qui donnent en outre des valeurs nettement plus faibles que Woods *et al.* (1975) et *a fortiori* que Woods *et al.* (1983).

Le travail de Guichard *et al.* (1979) concerne la détermination, par radioimmunologie, des quantités de testostérone sécrétées par les gonades d'embryons de Poulet mâles et femelles de 15 et 18 jours cultivées sur des milieux contenant ou non de la prégnénone, de la déhydroépiandrostérone ou de l'androstènedione. Il donne lieu aux remarques suivantes. Les grandes quantités de testostérone trouvées dans les milieux de culture additionnés d'androstènedione peuvent s'expliquer par l'importance de la réaction croisée de l'immunsérum anti-testostérone avec ce stéroïde (0,7 %). D'une façon analogue, l'absence de réaction croisée de l'immunsérum anti-testostérone avec la prégnénone suffit à expliquer que les quantités de testostérone trouvées soient grosso modo les mêmes dans les milieux témoins et dans ceux additionnés de prégnénone. Par contre, dans le cas de la déhydroépiandrostérone, la réaction croisée (0,01 %) ne contribue que pour une part minime aux quantités de testostérone trouvées. Aussi, tout au moins en ce qui concerne la déhydroépiandrostérone, peut-on suivre les auteurs quand ils concluent à son utilisation par les gonades des 2 sexes et à sa transformation en testostérone. Mais on comprend difficilement que les testicules ne produisent pas plus de testostérone que les gonades femelles, comme on comprend mal leur incapacité à utiliser la prégnénone comme précurseur.

On se trouvait donc en présence de résultats favorables à la thèse de la sécrétion de testostérone par le testicule embryonnaire de Poulet, mais qui n'étaient pas inattaquables. Notre travail n'avait d'autre but que d'essayer de clarifier le débat en étudiant la capacité du testicule embryonnaire de Poulet à transformer la déhydroépiandrostérone- ^3H et l'androstènedione- ^3H en testostérone- ^3H .

Matériel et méthodes.

Matériel biologique. — Découpés en trois ou quatre, les testicules mis en culture provenaient d'embryons de Poulet de race Leghorn blanche âgés de 16 à 19 jours. A titre de comparaison, nous avons aussi cultivé quelques testicules d'embryon de Souris Swiss de 14 et 19 jours découpés en deux.

Culture d'organes. — Le milieu de culture était le milieu 199, dont 0,7 ml garnissaient la logette de la boîte de Pétri pour culture d'organes « Falcon ». Les

explants représentant 3-4 paires de testicules étaient placés sur un disque de papier filtre « Durieux » auquel le milieu 199 affleurait. Ils étaient ensuite baignés dans 3-4 μl de la solution du précurseur radioactif répartis sur le filtre (1 μl par paire de testicules). L'incubation était faite à 37 °C pendant 24 h dans une atmosphère enrichie en oxygène et en gaz carbonique.

Précurseurs radioactifs. — L'androstènedione-1, 2, 6, 7-³H et la déhydro-épiandrostérone-1, 2, 6, 7-³H utilisées provenaient du Radiochemical Centre (Amersham) ; leur pureté radiochimique était de 97 % et leur activité spécifique respectivement de 69 et 64 Ci/mmol. Elles étaient mises en solution dans le mélange propane-1,2-diol-liquide de Tyrode 1 : 3 à la concentration radioactive de 0,30-0,39 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, qui correspondait à une concentration molaire approximativement 5 μM .

Extraction de la testostérone, chromatographie et recristallisations. — Au terme des 24 h de culture, le milieu a été recueilli. Le disque de papier filtre, ainsi que les explants, ont été rincés avec 3 \times 0,5 ml de liquide de Tyrode, qui ont été ajoutés au milieu de culture. Le milieu et les liquides de rinçage, additionnés de 100 μg de testostérone non radioactive comme entraîneur, ainsi que d'une quantité traceuse de testostérone-¹⁴C (New England Nuclear, Boston), ont été extraits par 3 \times 10 ml d'éther éthylique. Les extraits étherés ont été réunis et concentrés à 0,2 ml, qui ont été déposés sur une couche mince de gel de silice.

Après une double chromatographie dans le système de solvants chloroforme-éther éthylique 9 : 1, la testostérone est repérée aux rayons UV, puis on enregistre la répartition de la radioactivité sur la couche mince au moyen d'un lecteur de radiochromatogrammes. La zone de la couche mince où a migré la testostérone est recueillie, la testostérone est éluée, puis acétylée. Après chromatographie dans le système de solvants cyclohexane-acétate d'éthyle 7 : 3, l'acétate de testostérone est mélangé à 20 mg de produit non radioactif et recristallisé alternativement dans les systèmes méthanol-dichlorométhane-éther de pétrole et méthanol-chloroforme-éther de pétrole. Les cristaux mettent plusieurs jours à se former et se présentent sous la forme de prismes et de rhomboèdres enchevêtrés.

Après chaque recristallisation, on prélève environ 1 mg de cristaux et environ 1 mg d'eaux-mères, qui sont ensuite repesés à 0,008 mg près à l'aide d'une micro-balance. La mesure de la radioactivité se fait au moyen d'un compteur à scintillation en milieu liquide dont les fenêtres sont réglées de telle sorte à éviter tout passage de ³H dans la voie du ¹⁴C. 12 % de ¹⁴C passent dans la voie du ³H et sont déduits de l'activité totale dans cette voie. Dans ces conditions, le rendement du comptage est de 60 % pour le ¹⁴C et de 33 % pour le ³H, le bruit de fond étant respectivement de 15 et 10 coups/min. Le comptage est prolongé le temps qu'il faut pour réduire l'incertitude au seuil de 95 % à moins de 3 %. Dans ces conditions, l'incertitude sur la détermination de l'activité spécifique est inférieure à 5 %. Conformément au critère établi par Axelrod *et al.* (1965), l'activité spécifique sera considérée comme constante, et par conséquent l'acétate de testostérone identifié, si, au cours de 3 recristallisations successives, l'écart entre les valeurs extrêmes et la moyenne est inférieur à 5 %.

Ajoutons que l'activité spécifique par rapport au ^{14}C permet de calculer le pourcentage de récupération, dont il sera tenu compte dans le calcul du pourcentage de transformation des précurseurs tritiés en testostérone.

Résultats.

Une expérience préliminaire était destinée à vérifier que testostérone tritiée et testostérone marquée au ^{14}C subissaient les mêmes pertes au cours de l'analyse. Les résultats consignés dans le tableau 1 indiquent un pourcentage de récupération identique pour les 2 isotopes. L'utilisation de testostérone- ^{14}C pour l'évaluation des pertes de la testostérone- ^3H est donc licite.

Dans les 2 premières expériences, l'addition de testostérone- ^{14}C au milieu de culture avant l'analyse avait été omise à dessein, afin de limiter l'enregistrement de la radioactivité aux seuls métabolites tritiés (fig. 1-4). Le radiochromatogramme 1 se rapportant aux testicules embryonnaires de Poulet montre que la zone de la testostérone est active, mais on voit sur le radiochromatogramme 2 que l'activité accompagnant l'acétate de testostérone ne diffère pas du bruit de fond à la sensibilité maximale de l'appareil. En revanche, dans le cas des testicules embryonnaires de Souris, le pic de radioactivité associé à la testostérone (fig. 3) reste associé à l'acétate de testostérone (fig. 4). Cette expérience démontre que la testostérone sécrétée dans le milieu de culture est aisément décelable.

Dans les expériences suivantes, une quantité traceuse de testostérone- ^{14}C avait été ajoutée au milieu de culture avant l'analyse, de telle sorte que le pourcentage de récupération a pu être déterminé. Le tableau 2 donne les conditions expérimentales et les résultats dans le cas de l'utilisation de la déhydroépidandrostérone- ^3H comme précurseur, les données du tableau 3 se rapportant à l'utilisation de l'androstènedione- ^3H .

TABLEAU 1

Comparaison des pourcentages de récupération de la testostérone tritiée et de la testostérone marquée au ^{14}C .

Activité spécifique (AS) exprimée en coups/min/mg. Les valeurs constantes sont encadrées.

	Testostérone- ^3H	Testostérone- ^{14}C
Cristaux 1	2 417	687
Eaux-mères 1	2 448	672
Cristaux 2	2 424	693
Eaux-mères 2	2 400	680
Cristaux 3	2 387	663
AS constante	2 415	679
% constance	1,4 %	2,4 %
Activité totale ($\times 20$)	48 304	13 580
Activité ajoutée	56 490	15 960
% récupération	86	85

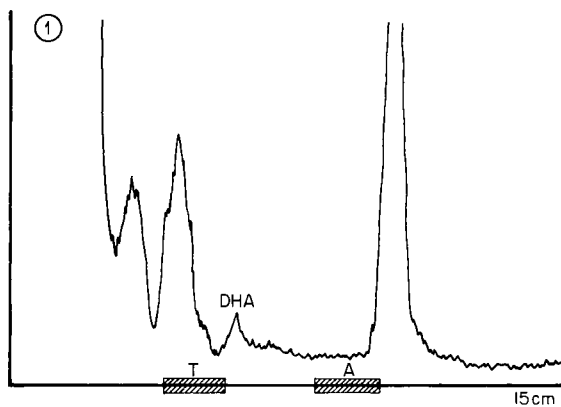


FIG. 1. — Radiochromatogramme des métabolites formés à partir de déhydroépiandrosté- 3H par 30 paires de testicules embryonnaires de Poulet de 16 jours.

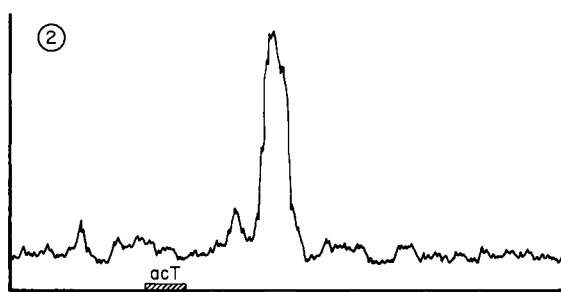


FIG. 2. — Radiochromatogramme obtenu après élution de la testostérone et acétylation.

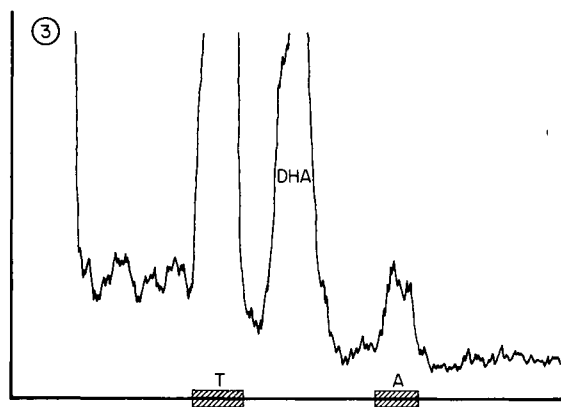


FIG. 3. — Radiochromatogramme des métabolites formés à partir de déhydroépiandrosté- 3H par 5 paires de testicules embryonnaires de Souris de 19 jours.

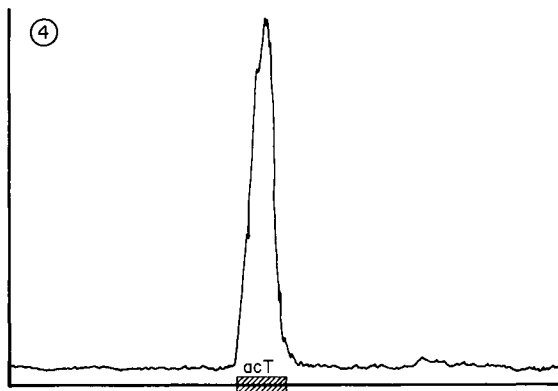


FIG. 4. — Radiochromatogramme obtenu après élution de la testostérone et acétylation. Explication des graphiques dans le texte. A : androstènedione ; T : testostérone ; DHA : déhydroépiandrostérone.

Comme il ressort de l'examen des 2 tableaux, la seule expérience où la constance de l'activité spécifique par rapport au ^3H ait été obtenue est l'expérience 6, où les testicules provenaient d'embryons de Souris. Dans ce cas, la testostérone est donc identifiée et sa formation à partir de déhydroépiandrostérone démontrée. Dans tous les autres cas, où les testicules provenaient d'embryons de Poulet, l'activité spécifique était soit nulle soit subissait des fluctuations irrégulières. Mais admettons que dans chaque cas la valeur la plus faible corresponde à de l'acétate de testostérone pur. Les pourcentages de transformation qu'on obtient dans ces conditions sont infimes, de l'ordre de 0,05 %, et sans commune mesure avec les 37 % qui figurent dans la colonne 6 se rapportant aux testicules embryonnaires de Souris.

Discussion.

Comme il s'agit d'un travail où les méthodes employées sont d'une importance capitale commençons par discuter les conditions de nos expériences.

Utiliser la déhydroépiandrostérone et l'androstènedione tritiées aux concentrations 86-87 μM auxquelles Guichard *et al.* (1979) avaient utilisé ces mêmes substances à l'état non radioactif eût été trop coûteux. De plus, de telles concentrations pouvaient paraître excessives. Mais en déposant la solution radioactive sur le filtre, au lieu de la mélanger d'emblée aux 0,7 ml de milieu, nous avons réalisé un gradient de concentrations allant de 5 μM à 7 nM en fin de diffusion. Que ces conditions sont propices à l'utilisation des précurseurs et à leur transformation en testostérone est attesté par l'expérience 2 ayant trait aux testicules embryonnaires de Souris (fig. 3 et 4). L'absence de pic de radioactivité dans la zone de l'acétate de testostérone sur la figure 2 se rapportant aux testicules embryonnaires de Poulet signifie que dans ce cas la formation de testostérone a été insignifiante, à moins d'admettre que les pertes de testostérone aient été pratiquement

TABLEAU 2

Conditions expérimentales et résultats dans le cas de l'utilisation de la déhydroépiandrosterone-³H comme précurseur.
 Activité spécifique (AS) des cristaux et des eaux-mères exprimée en coups/min/mg. Les valeurs constantes sont encadrées.

	Expérience 3 11 p. testicules Poulet 17 j		Expérience 4 10 p. testicules Poulet 18 j		Expérience 5 9 p. testicules Poulet 19 j		Expérience 6 6 p. testicules Souris 14 j	
	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H
Cristaux 1	943	86	863	50	760	95	795	8 743
Eaux-mères 1	902	1 962	1 029	1 544	770	337	803	9 057
Cristaux 2	931	74	858	3	750	79	775	8 341
Eaux-mères 2	926	295	869	106	740	58	803	8 591
Cristaux 3	942	67	859	-3	744	80	803	8 624
Eaux-mères 3	910	42	868	39	748	36	787	8 517
Cristaux 4	936	73	872	-7	765	95		
Eaux-mères 4	930	39	869	-5	764	54		
Cristaux 5	918	97	876	-6	770	47		
Eaux-mères 5	909	53	854	-4	782	231		
Cristaux 6	914	43			756	28		
Eaux-mères 6	925	188			776	116		
AS constante	924	# 39	865	0	760	# 28	794	8 563
% constance	2,4		1,3		2,8		2,4	2,6
Activité totale	18 480		17 300		15 200		15 880	171 260
Activité initiale	21 400	3 128 000	21 250		20 450	2 655 000	20 450	590 000
% récupération	86		81		74		78	
% transformation		0,03		0		0,03		37

TABLEAU 3

Conditions expérimentales et résultats dans le cas de l'utilisation de l'androstènedione-³H comme précurseur.

Activité spécifique (AS) des cristaux et des eaux-mères exprimée en coups/min/mg. Les valeurs constantes sont encadrées.

	Expérience 7 10 p. testicules Poulet 17 j.		Expérience 8 12 p. testicules Poulet 17 j.	
	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H
Cristaux 1	846	98	892	138
Eaux-mères 1		952	872	6 753
Cristaux 2	844	79	913	103
Eaux-mères 2		862	911	343
Cristaux 3	849	81	917	92
Eaux-mères 3		859	925	253
Cristaux 4	844	77	921	107
Eaux-mères 4		871	927	76
Cristaux 5	829	101	915	116
Eaux-mères 5		822	—	—
Cristaux 6			927	144
Eaux-mères 6			907	72
AS constante	839	# 33	912	# 72
% constance	2,0		4,3	
Activité totale	16 780		18 240	
Activité initiale	21 200	2 220 000	21 400	2 660 000
% récupération	79		85	
% transformation		0,04		0,06

totales. Mais la grande uniformité du pourcentage de récupération dans les expériences ultérieures rend cette hypothèse invraisemblable.

Ensuite il y a lieu de s'arrêter aux conditions de recristallisation, puisque d'elles dépendent les résultats sur lesquels est basée l'identification de la testostérone. L'utilisation de systèmes de solvants purement organiques garantit une recristallisation lente, évitant au maximum l'emprisonnement de molécules étrangères dans le réseau cristallin. Néanmoins, une certaine syncristallisation s'est produite, vraisemblablement en raison d'une grande similitude de structure de l'un ou l'autre métabolite avec la testostérone. Mais cette syncristallisation est très irrégulière, se traduisant par des fluctuations de l'activité spécifique n'obéissant à aucune loi (tabl. 2 et 3). Si de tels résultats ne permettent pas d'affirmer l'identité de la testostérone, ils ne permettent pas non plus d'exclure formellement la formation de traces de testostérone, comme il a été dit plus haut. Nous nous trouvons donc en face du dilemme suivant : le testicule embryonnaire de Poulet sécrète-t-il des traces de testostérone ou bien n'en sécrète-t-il pas du tout ? Etant donné que dans l'expérience 4 des conditions de recristallisation sans doute éminemment favorables ont permis d'obtenir une activité spécifique nulle, nous inclinons vers l'absence totale de sécrétion de testostérone.

Ce point de vue est corroboré par l'absence d'action biologique du testicule embryonnaire de Poulet sur les organes effecteurs de la testostérone : 1) A

l'inverse du testicule embryonnaire de Souris, le testicule embryonnaire de Poulet ne stimule pas le développement du canal de Wolff d'embryon de Souris en culture *in vitro* (Weniger, 1965 ; Weniger et Zeis, 1980). 2) A l'inverse du testicule embryonnaire de Rat, le testicule embryonnaire de Poulet ne stimule pas le développement du canal de Wolff d'embryon de Poulet (Chouraqui *et al.*, 1980). De plus, il n'y a pas de signe de sécrétion de testostérone avant la 3^e semaine chez le poussin mâle, quand commence la différenciation de l'épididyme (Maraud, 1963). Enfin, si le testicule embryonnaire de Poulet de 17 jours renferme de rares cellules de Leydig présomptives, elles n'ont pas les caractères ultrastructuraux typiques de cellules stéroïdogènes actives (Carlou et Erickson, 1978).

La question est alors de savoir comment Haffen et Cédard (1968) et Guichard *et al.* (1973 et 1979) ont pu affirmer la production de testostérone par le testicule embryonnaire de Poulet. En ce qui concerne les expériences radiochimiques (Haffen et Cédard, 1968 ; Guichard *et al.*, 1973), l'utilisation de systèmes de solvants aqueux pour les recristallisations a pu empêcher une purification efficace. Quant aux dosages radioimmunologiques (Guichard *et al.*, 1979), on peut penser à un manque de spécificité de l'immunsérum anti-testostérone.

Conclusion.

En conclusion, à la question posée dans ce travail nous apportons une réponse négative : le testicule embryonnaire de Poulet de 17-19 jours est incapable de transformer la déhydroépiandrostérone et l'androstènedione en testostérone. Cette conclusion rejoint l'absence de rôle physiologique reconnu à la testostérone chez l'embryon de Poulet.

Reçu en septembre 1983.

Accepté en novembre 1983.

Références

- AXELROD L. R., MATTHIJSSEN C., GOLDZIEHER J. W., PULLIAM P. E., 1965. Definitive identification of microquantities of radioactive steroids by recrystallization to constant specific activity. *Acta endocrin.*, suppl. **99**, 7-66.
- CARLON N., ERICKSON G. F., 1978. Fine structure of prefollicular and developing germ cells in the male and female left embryonic chick gonads *in vitro* with and without androgenic steroids. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **18**, 335-349.
- CÉDARD L., GUICHARD A., HAFFEN K., 1970. Métabolisme de la prégnénonone-7 α -³H et de la progestérone-4-¹⁴C par les gonades embryonnaires de Poulet cultivées *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **271** (Série D), 1707-1710.
- CHOURAQUI J., ZEIS A., WENIGER J.-P., 1980. Etude comparative en culture *in vitro* de l'action des testicules embryonnaires de Poulet et de Rat sur le canal de Wolff d'embryon de Poulet. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **69**, 167-173.
- GASC J.-M., THIBIER M., 1979. Plasma testosterone concentration in control and testosterone-treated chick embryos. *Experientia*, **35**, 1411-1412.

- GUICHARD A., CÉDARD L., HAFFEN K., 1973. Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). *Gen. comp. Endocrin.*, **20**, 16-28.
- GUICHARD A., CÉDARD L., MIGNOT Th.-M., SCHEIB D., HAFFEN K., 1979. Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in presence of some exogenous steroid precursors. *Gen. comp. Endocrin.*, **39**, 9-19.
- GUICHARD A., MIGNOT Th. M., CÉDARD L., ANGUELOVA P., SCHEIB D., 1983. Control of the hormonal secretions of quail embryo gonads (normal and DES-treated) : *in vitro* effects of testosterone and of hCG. *Gen. comp. Endocrin.*, **51**, 347-352.
- HAFFEN K., CÉDARD L., 1968. Etude, en culture organotypique *in vitro*, du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testostérone radioactives par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de Poulet. *Gen. comp. Endocrin.*, **11**, 220-234.
- MARAUD R., 1963. Recherches expérimentales sur les facteurs inducteurs de la formation de l'épididyme du Coq (*Gallus gallus*). *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **52**, 83-127.
- OTTINGER M. A., BAKST M. R., 1981. Peripheral androgen concentrations and testicular morphology in embryonic and young male Japanese quail. *Gen. comp. Endocrin.*, **43**, 170-177.
- SCHEIB D., GUICHARD A., MIGNOT Th. M., CÉDARD L., 1981. Steroidogenesis by gonads of normal and of diethylstilbestrol-treated quail embryos : radioimmunoassays on organ cultures. *Gen. comp. Endocrin.*, **43**, 519-526.
- WENIGER J.-P., 1965. Etude comparée des actions hormonales des testicules embryonnaires de Poulet et de Souris en culture *in vitro*. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, **54**, 909-919.
- WENIGER J.-P., 1969. Recherches sur la nature chimique des hormones sexuelles embryonnaires de Poulet. *Ann. Embr. Morph.*, **2**, 433-444.
- WENIGER J.-P., 1970. Le testicule embryonnaire de Poulet sécrète-t-il de la testostérone ? *Arch. Anat. Hist. Embr.*, **53**, 97-105.
- WENIGER J.-P., ZEIS A., 1973. Recherches sur la nature chimique de l'hormone testiculaire de l'embryon de Poulet. *Ann. Embr. Morph.*, **6**, 219-228.
- WENIGER J.-P., ZEIS A., 1976. Androgènes et régression des canaux de Müller chez l'embryon de Poulet : nouvelles recherches. *Arch. Anat. Hist. Embr.*, **59**, 19-32.
- WENIGER J.-P., ZEIS A., 1977. Hormone anti-müllérienne d'Oiseau et testostérone. *Arch. Anat. Hist. Embr.*, **60**, 189-196.
- WENIGER J.-P., ZEIS A., 1980. Etude comparative de l'action du testicule embryonnaire de Poulet et de la testostérone sur divers organes effecteurs en culture *in vitro*. *Arch. Anat. Hist. Embr.*, **63**, 179-188.
- WOODS J. E., RUTHERFORD J. E., THOMMES R. C., 1983. Functional development of the hypothalamic-adenohypophyseal-testicular axis in the chick embryo. *Gen. comp. Endocrin.*, **50**, 235-241.
- WOODS J. E., SIMPSON R. M., MOORE P. L., 1975. Plasma testosterone levels in the chick embryo. *Gen. comp. Endocrin.*, **27**, 543-547.
-