



**HAL**  
open science

# Rôle de l'AMPcyclique dans le contrôle de la maturation méiotique de l'ovocyte de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Benoît Finet

## ► To cite this version:

Benoît Finet. Rôle de l'AMPcyclique dans le contrôle de la maturation méiotique de l'ovocyte de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rennes 1, 1989. Français. NNT: . tel-02857657

**HAL Id: tel-02857657**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02857657v1>**

Submitted on 3 Jul 2024

**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.

UNIVERSITE DE RENNES I

THESE

PRESENTEE PAR

Benoit FINET

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES I

ROLE DE L'AMP CYCLIQUE  
DANS LE CONTROLE DE LA MATURATION MEIOTIQUE DE L'OVOCYTE DE  
TRUITEARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*).

Soutenu le 17 Octobre 1989

devant le jury composé de :

Mr J. JOLY	Président
Mr C. THIBAUT	Rapporteur
Mr L. MEIJER	Rapporteur
Mr B. JALABERT	Examineur
Mr R. OZON	Examineur

## AVANT-PROPOS

Les travaux rapportés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Physiologie des Poissons de l'INRA à Rennes.

Je tiens à remercier Monsieur J. JOLY qui a bien voulu accepter la direction de cette thèse et la présidence de ce jury.

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur C. THIBAULT. C'est pour moi un honneur qu'il ait accepté de juger ce travail.

Je voudrais remercier Monsieur L. MEIJER qui très gentiment a accepté de prendre connaissance et d'apporter un jugement à ce mémoire.

Je suis heureux d'exprimer ici toute ma gratitude à Bernard JALABERT qui fut l'instigateur de ce travail et qui a bien voulu durant toutes ces années me faire bénéficier de la richesse de son expérience et de la qualité de son encadrement. Qu'il soit remercié également pour le temps passé à la recherche du financement qui m'a permis d'achever ce travail. Je me permets de lui témoigner ici toute mon amitié.

Je remercie vivement Monsieur R. OZON qui a accepté de faire partie de ce jury. Ces travaux, ainsi que ceux menés sous sa direction au sein du laboratoire de physiologie de la reproduction de l'Université Pierre et Marie Curie, furent toujours pour moi un exemple.

Je tiens également à remercier Madame O. MULNER-LORILLON et Monsieur R. BELLE de ce même laboratoire pour les encouragements qu'ils ont su me prodiguer.

Je tiens à remercier Messieurs Bernard BRETON et Alexis FOSTIER qui ont bien voulu m'accueillir au sein du Laboratoire de Physiologie des Poissons dont ils ont successivement assuré la direction. Ils ont toujours su contourner les difficultés administratives que pouvait poser ma présence au sein du laboratoire et me faire bénéficier des grandes compétences scientifiques qui sont les leurs. Qu'ils me permettent de leur exprimer ma respectueuse amitié.

Je voudrais remercier également tous ceux et toutes celles qu'il m'a été donné de côtoyer journallement au sein du laboratoire de Physiologie des Poissons. Leur soutien et leur amitié me furent précieux durant toutes ces années et je tiens à leur témoigner ici toute ma sympathie.

De toutes les personnes que ce travail m'a permis de rencontrer certaines sont devenues de véritables amis et ils savent à quel point je leur en suis reconnaissant. Parmi ceux-ci André et Valérie tiennent une place à part et les remerciements que je leur dois sont au-delà des mots. Qu'ils me permettent encore une fois de leur exprimer toute mon affection.

Cette Thèse a été financée par la société JACOBS France, et par l'Institut National de la Recherche Agronomique.

Les résultats exposés dans ce mémoire ont, pour partie, été publiés dans 2 articles cités en fin d'ouvrage (bibliographie).

A mes Parents, mes Amis, tous mes proches.

A Isabelle.

Rien de ceci n'aurait été possible sans leur amour et sans leur amitié.

## Table des matières

AVANT-PROPOS.....	2
RESUME.....	7
INTRODUCTION GENERALE .....	8
Matériels et Méthodes .....	17
1.    GESTION DES ANIMAUX.....	18
2.    INCUBATIONS DE COURTES DUREES (48H.) .....	19
3. INCUBATIONS DE LONGUES DUREES (3 à 7.J.).....	21
4.    MICROSCOPIE A BALAYAGE.....	22
5. ETUDE DES FLUCTUATIONS DES NIVEAUX D'AMP <sub>c</sub> OVOCYTAIRES .	23
6 PRODUITS.....	24
L'AMP <sub>c</sub> joue-t-il un rôle dans le déclenchement de la maturation ovocytaire ?	
Expérimentation sur ovocytes intrafolliculaires .....	26
I - INTRODUCTION.....	27
II – RESULTATS.....	29
1.    INHIBITION DE LA MATURATION OVOCYTAIRE .....	29
2.    FLUCTUATION DES NIVEAUX D'AMP <sub>c</sub> OVOCYTAIRES LORS DE L'INDUCTION DE LA MATURATION PAR LA 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP .....	33
3.    VARIATION DES NIVEAUX D'AMP <sub>c</sub> AUCOURS DE LA FIN DU CYCLE OVARIEN	38
III. DISCUSSION.....	40
Effet de la défollicularisation sur les niveaux d'AMP <sub>c</sub> intraovocytaires.....	45

I - INTRODUCTION.....	47
-----------------------	----

II. RESULTATS .....	49
---------------------	----

III - DISCUSSION.....	54
-----------------------	----

Une Chute des niveaux d'AMPc est elle une condition nécessaire à la reprise de la meiose ? Expérimentation sur ovocytes défollicularisés .....	59
---	----

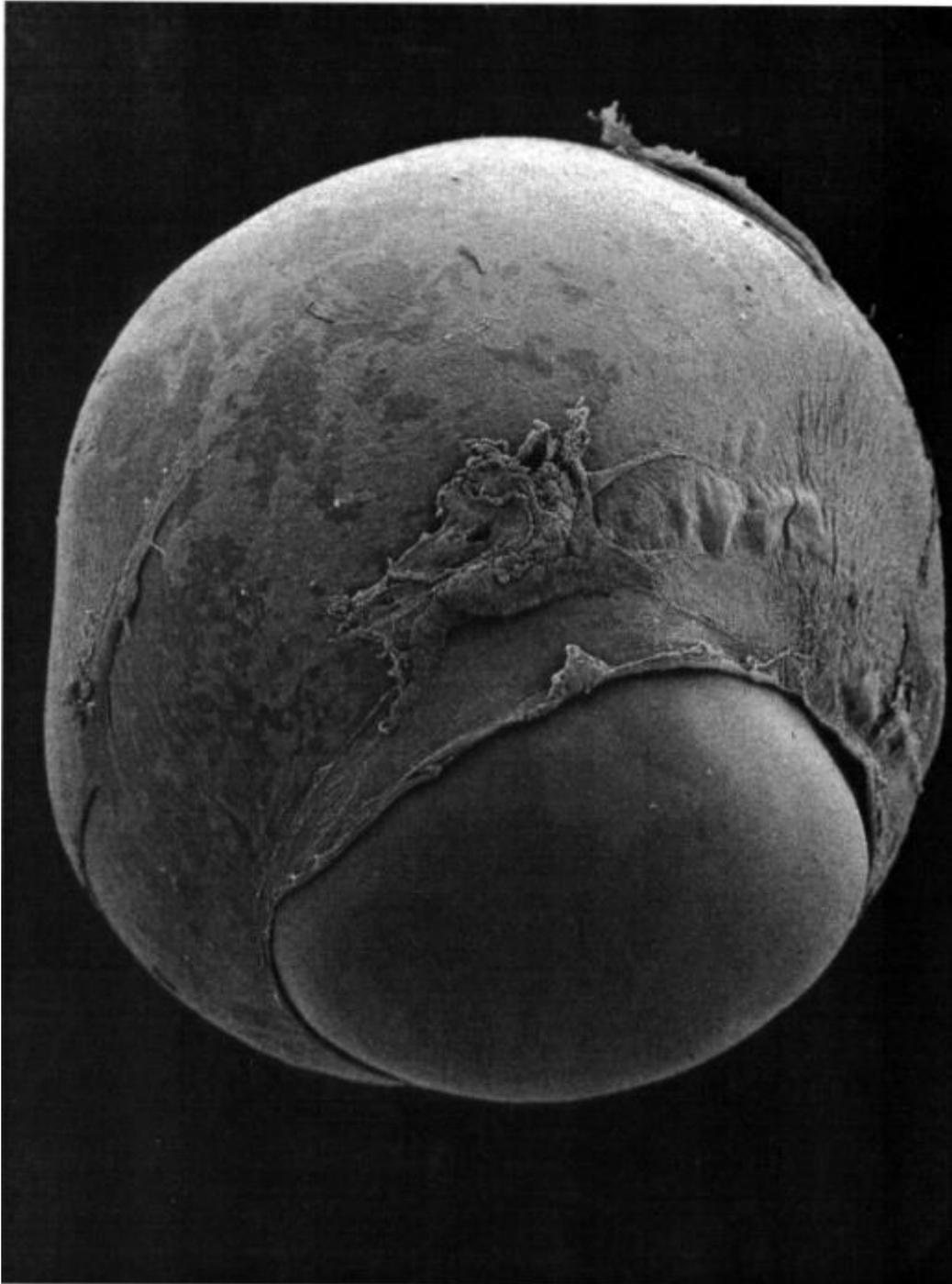
I - INTRODUCTION.....	60
-----------------------	----

III - RESULTATS.....	62
----------------------	----

III. DISCUSSION.....	68
----------------------	----

DISCUSSION GENERALE CONCLUSIONS ET CONJECTURES .....	77
--	----

BIBLIOGRAPHIE.....	85
--------------------	----



Ovocyte de truite partiellement dénudé

## RESUME

Afin d'étudier chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le rôle de l'AMPc lors de l'induction de la reprise de la méiose ovocytaire, nous avons utilisé des techniques d'incubation in vitro d'ovocytes débarrassés, ou non, de leurs cellules folliculaires (dénudés ou non). La disparition de la membrane nucléaire (GVBD) nous a servi de critère pour attester de la reprise de la méiose des ovocytes.

In vitro, les inhibiteurs de phosphodiesterase (iso-butilméthylxanthine ou IBMX > 0,1 mM; théophylline > 1 mM), les substances stimulant l'adénylate cyclase (toxine cholérique > 100 nM ; forskoline > 30 M), ou l'AMPc lui-même (>8mM), bloquent l'induction de la reprise de la méiose par la  $17\alpha 20\beta$ DHP. L'association de la forskoline et de l'IBMX, déclenche en moins d'une heure, une augmentation très importante de l'AMPc ovocytaire. Des concentrations maturantes ( $3.10^{-6}$ M) de  $17\alpha 20\beta$ DHP, provoquent une diminution de faible ampleur des niveaux d'AMPc mesurés chez des ovocytes non dénudés. Ces résultats laissent penser qu'une chute des niveaux d'AMPc pourrait être à l'origine du déclenchement de la reprise de la méiose, et qu'au contraire les fortes concentrations en nucléotide inhibent la maturation. Nous avons montré pourtant, que l'augmentation de sensibilité à l'hormone maturante qui survient en fin de cycle ovarien, s'accompagne d'une augmentation de la concentration ovocytaire en AMPc.

La dénudation manuelle ou enzymatique des ovocytes, provoque une augmentation importante des niveaux d'AMPc ovocytaires. L'incubation d'ovocytes non dénudés en présence d'inhibiteurs des synthèses protéiques (cycloheximide, puromycine) reproduit ce phénomène, ce qui n'est pas le cas des inhibiteurs de la stéroïdogenèse. L'insuline est capable d'empêcher la montée d'AMPc induite par la puromycine. Nos premiers résultats montrent qu'il pourrait en être de même pour l'IGF1. Les niveaux d'AMPc ovocytaires pourraient donc être régulés négativement par un facteur protéique (ou peptidique) d'origine folliculaire, éventuellement de type IGF1.

La  $17\alpha 20\beta$ DHP ( $3.10^{-6}$ M) fait chuter de manière importante les niveaux d'AMPc ovocytaires lorsque ceux-ci sont préalablement augmentés par la dénudation. Trois points nous font pourtant penser que cette chute de l'AMPc ovocytaire, n'est pas directement à l'origine de la reprise de la méiose :

- Les niveaux d'AMPc d'ovocytes dénudés et traités par des concentrations maturantes de  $17\alpha 20\beta$ DHP restent supérieurs à ceux des ovocytes témoins (ni dénudés ni traités) qui eux ne mûrissent pas.

- Des concentrations non maturantes de  $17\alpha 20\beta$ DHP provoquent la même chute d'AMPc que des concentrations plus élevées de  $17\alpha 20\beta$ DHP qui induisent la reprise de la méiose.

- La testostérone, l'insuline et certains dérivés de la  $17\alpha 20\beta$ DHP qui ne provoquent pas la reprise de la méiose ovocytaire chez la truite arc-en-ciel, induisent une chute d'AMPc comparable à celle provoquée par la  $17\alpha 20\beta$ DHP.

**MOTSCLES** : Maturation ovocytaire, AMPc, truite arc-en-ciel, facteurs folliculaires inhibiteurs.

## INTRODUCTION GENERALE

La reproduction sexuée implique chez la plupart des animaux pluricellulaires, la production de cellules haploïdes spécialisées, ou gamètes, ne comprenant qu'un seul jeu de chromosomes. La fusion de 2 gamètes au moment de la fécondation permettra la formation d'un nouvel individu diploïde. C'est au cours : de la méiose, division cellulaire d'un type particulier, que s'effectue cette réduction du nombre de chromosomes. Chez la femelle, le passage d'une cellule diploïde (ovogonie) à une cellule haploïde (ovocyte secondaire) se fait par étapes. Après une phase de multiplication, qui chez les poissons téléostéens semble pouvoir être observée de façon plus ou moins périodique chez tous les animaux sexuellement matures (voir pour revue TOKARZ, 1978), les ovogonies entament leur division méiotique et se différencient en ovocytes primaires. La méiose est alors interrompue.

Le noyau de l'ovocyte ou vésicule germinative (VG) reste bloqué en fin de prophase de cette première division de méiose, pour une période pouvant aller de quelques jours à plusieurs années suivant les espèces. Chez la plupart des vertébrés la reprise de la méiose, appelée indifféremment maturation méiotique ou ovocyttaire, intervient peu de temps avant l'ovulation et aboutit à la formation d'un ovocyte secondaire fécondable.

Durant leur blocage en prophase de méiose, les ovocytes accumulent les substances de réserve (glycoprotéines, lipovitellines, phospholipides) et les composants utilisés durant le développement embryonnaire (nucléoles, ARN messagers). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), l'ovocyte en fin de croissance peut atteindre 4 à 5 mm de diamètre. La vésicule germinative d'environ 250  $\mu\text{m}$  de diamètre gagne

progressivement la périphérie de l'ovocyte. Elle est alors facilement discernable et apparait à la loupe binoculaire comme une tache claire au contour bien défini. Dans ces conditions, la maturation ovocytaire se caractérise au niveau macroscopique par la disparition de la vésicule germinative, conséquence de la rupture de la membrane nucléaire ("germinal vesicle breakdown" ou GVBD), et par un éclaircissement général de l'ovocyte dû à la fusion des gouttelettes vitellines et à leur migration à la périphérie de l'ovocyte (JALABERT et FOSTIER, 1984).

Comme chez les amphibiens, il est maintenant clairement établi pour de nombreuses espèces de poissons, que la reprise de la méiose est induite par un stéroïde, sécrété par les cellules folliculaires en réponse à une stimulation gonadotrope. Chez la truite arc-en-ciel, un dérivé de la progestérone, la  $17\alpha$ hydroxy, $20\beta$ -dihydroprogestérone ( $17\alpha$  $20\beta$ DHP), produite in vitro par les cellules folliculaires sous stimulation gonadotrope (FOSTIER et al., 1981a), apparait comme le stéroïde le plus actif pour provoquer la reprise de la méiose (FOSTIER et al., 1973 ; JALABERT et FINET, 1986). Elle agit contrairement à la GtH sur des ovocytes débarrassés de leurs cellules folliculaires (JALABERT, 1976), et voit ses niveaux plasmatiques augmenter brutalement dans les 2 jours qui précèdent la GVBD (FOSTIER et al., 1981b). De nombreux travaux effectués sur d'autres espèces sont venus confirmer ces observations, et il semble que la  $17\alpha$  $20\beta$ DHP soit effectivement le principal stéroïde inducteur de la maturation (SIM) non seulement chez les salmonidés mais probablement aussi chez d'autres téléostéens (NAGAHAMA, 1987 ; GOETZ, 1983).

Les mécanismes cellulaires, mis en jeu lors de l'induction de la maturation ovocytaire par la  $17\alpha$  $20\beta$ DHP chez les poissons, ou par la progestérone chez les amphibiens, ne s'apparentent pas à ceux classiquement décrits pour l'action d'un stéroïde.

Chez les poissons, la maturation ovocytaire n'est pas bloquée par les inhibiteurs de transcription (actinomycine D, mitomycine C), mais par les inhibiteurs de synthèse protéique (cycloheximide, puromycine) (DETLAFF et SKOBLINA, 1969 ; GOSWAMI et SUNDARARAJ, 1973 ; JALABERT, 1976 ; THEOFAN et GOETZ, 1981).

Les mêmes types de résultats ont été rapportés chez les amphibiens (DETLAFF et SKOBLINA 1969 ; SMITH et ECKER, 1970 ; SCHORDERET-SLATKINE, 1972). De plus chez le Xénope, l'apparition dans le cytoplasme ovocytaire d'un facteur protéique inducteur de la maturation ("maturation promoting factor" ou MPF) n'est bloquée ni par l'actinomycine D, ni par l'énucléation des ovocytes (SKOBLINA, 1969 ; SMITH et ECKER, 1969 ; MASUI et MARKERT, 1971). L'action des stéroïdes lors de l'induction de la maturation ovocytaire se rapprocherait plus, de par sa nature post transcriptionnelle, de celle des hormones peptidiques, que de celle des stéroïdes.

Cette constatation a poussé de nombreuses équipes travaillant sur la reprise de la méiose chez les amphibiens, à étudier le rôle de l'AMPc lors de l'induction de la maturation par la progestérone. Classiquement en effet, l'action des hormones protéiques (ou peptidiques) passe par la modification des niveaux d'AMPc intracellulaires. Chez les eucaryotes, l'AMPc permet l'activation d'une protéine kinase. Cette enzyme se compose de 2 types de sous-unités, l'une régulatrice (R), l'autre catalytique (C). La fixation de l'AMPc sur la sous-unité régulatrice permet la dissociation de R et de C. La forme libre de la sous-unité C catalyse les réactions de phosphorylation protéique (KREBS, 1972 ; KREBS et BEAVO, 1979). Chez les amphibiens, l'élévation artificielle des niveaux d'AMPc ovocytaires ne provoque pas la reprise de la méiose (SMITH et ECKER, 1971 ; SCHORDERET-SLATKINE, 1972 ; BRACHET et al., 1974). Les expériences menées ultérieurement sur le xénope mirent en évidence au contraire que les inhibiteurs de la dégradation de l'AMPc (IBMX : OZON et al., 1978 ; HUCHON et OZON 1979. Théophylline : O'CONNOR et SMITH,

1976 ; BRAVO et al., 1978 ; MALLER et al., 1979), les substances stimulant sa synthèse (toxine cholérique : SCHORDERET-SLATKINE et al., 1982a ; HUCHON et OZON 1979 ; MALLER et al., 1979. Forskoline : SCHORDERET-SLATKINE et BAULIEU, 1982), ou l'AMPc lui-même (MORRILL et al., 1977), inhibaient la maturation induite par la progestérone ou par le MPF (HUCHON et OZON 1979).

Ces résultats ont permis de bâtir l'hypothèse selon laquelle la progestérone se fixant à un récepteur membranaire, induirait la reprise de la méiose en provoquant la chute de l'AMPc intraovocytaire et la diminution du taux de phosphorylation de certaines protéines.

Les premiers travaux effectués pour tenter de mettre en évidence une diminution des niveaux d'AMPC, à la suite d'une stimulation stéroïdienne des ovocytes, ne furent pas concluants (DRURY et SCHORDERET-SLATKINE, 1975 ; PAYS-DE SCHUTTER et al., 1975 ; O'CONNOR et SMITH, 1976). MALLER et KREBS (1977) montrèrent pourtant que chez le xénope, la reprise de la méiose était inhibée par la micro injection de la sous-unité catalytique (C) de la protéine kinase AMPc dépendante, et que l'induction de la maturation pouvait être obtenue par micro injection dans l'ovocyte de la sous-unité régulatrice, ou de l'inhibiteur spécifique (PKI) de cette protéine kinase. La cinétique de maturation des ovocytes se situait dans ces 2 derniers cas, entre celles des ovocytes traités par la progestérone et celle des ovocytes ayant reçu une micro injection de MPF.

Il en a été conclu que la déphosphorylation d'une protéine dite de maturation ou MP, substrat de la protéine kinase AMPc-dépendante, serait une condition nécessaire et suffisante pour provoquer la reprise de la méiose. Cette déphosphorylation précéderait l'apparition du MPF et devrait logiquement résulter d'une diminution des niveaux d'AMPc intra ovocytaires.

Les résultats des études menées ultérieurement pour tenter de visualiser cette diminution furent contradictoires :

- Chez un autre amphibien *Rana pipiens*, une chute de 50 à 65% de la concentration ovocytaire en AMPc a été observée 30 mn après le traitement des ovocytes par la progestérone (SPEAKER et BUTCHER, 1977 ; MORRILL et al., 1977).

- Chez le Xénope, certains auteurs mirent en évidence une diminution des concentrations en AMPc (BRAVO et al., 1978 ; MALLER et al., 1979 ; SCHORDERETSLATKINE et al., 1982; CICIRELLI et SMITH, 1985), mais ni l'amplitude (de 10 à 50%), ni la cinétique (de 20 secondes à 3 heures) ne furent identiques d'une expérience à l'autre. Pour d'autres équipes (SCHORDERET-SLATKINE et al., 1978 ; THIBIER et al., 1982) l'effet de la progestérone ne fut visualisable qu'après augmentation préalable des niveaux de base par la toxine cholérique ou la forskoline. THIBIER et collaborateurs (1982) ont calculé à partir d'expériences de micro injection de PKI (HUCHON et al., 1981) qu'une diminution de 10 à 20% des niveaux d'AMPc devrait suffire à provoquer la reprise de la méiose. La faible amplitude de cette chute (souvent inférieure au seuil de détection) pourrait expliquer les contradictions rapportées précédemment entre les travaux des différentes équipes.

L'ambiguïté de ces résultats fut levée lorsqu'il a été démontré, à la fois sur ovocyte entier (MULNER et al., 1979) et sur préparation de membranes (SADLER et MALLER, 1981 ; FINIDORI-LEPICARD et al., 1981 ; JORDANA et al., 1981), que la progestérone diminuait l'activité adénylate cyclase des ovocytes de xénope. La chute de l'AMPc résulterait uniquement de l'action de la progestérone sur la fraction membranaire de l'adénylate cyclase (plus de 50 % de l'enzyme se trouve dans l'ovocyte sous forme soluble (FINIDORI et al., 1982)], et non de la stimulation de l'activité phosphodiesterase (MULNER et al., 1980 ; SADLER et MALLER, 1987).

Parallèlement, d'autres travaux tendaient à démontrer que les récepteurs aux stéroïdes, mis en jeu lors de l'induction de la maturation, se situeraient au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte :

- Les premières études effectuées chez les amphibiens ont mis en évidence que la micro injection de la progestérone en solution aqueuse ne provoquait pas la reprise de la méiose (SMITH et ECKER, 1971 ; MASTU et MARKERT, 1971).

- Par la suite, il a été démontré que des dérivés stéroïdiens, liés à des polymères (et donc supposés ne pas pouvoir pénétrer à l'intérieur de l'ovocyte) pouvaient induire la maturation des ovocytes (ISHIKAWA et al., 1977 ; GODEAU et al., 1978).

- Enfin, d'autres équipes montrèrent qu'un analogue synthétique de la progestérone le R5020, se fixait spécifiquement à une protéine membranaire de 110 KDa (SADLER et MALLER, 1982) ou 30 KDa (BAULIEU et al., 1985) alors qu'aucun récepteur cytosoluble n'avait pu être mis en évidence au sein des ovocytes d'amphibiens (voir pour revue, MALLER et KREBS, 1980).

D'autres résultats expérimentaux laissent supposer que le récepteur de la progestérone serait accessible par le compartiment intracellulaire et se situerait en fait sur le feuillet interne de la membrane plasmique. L'induction de la maturation a pu, en effet, être obtenue par micro injection de progestérone en solution lipidique (TSO et al., 1982), ou par l'addition au milieu de culture de digitoxigénine (CARTAUD et al., 1984) et non de digitoxine (de ces 2 composés agissant au niveau membranaire, seule la digitoxigénine peut pénétrer dans le compartiment intracellulaire).

Chez les poissons, le seul argument en faveur d'une action membranaire des stéroïdes provient d'expériences faites sur un poisson tropical, *Brachydanio rerio*, pour lequel VOOGT et DE GROOT (1983) ont montré qu'il était possible d'induire la

maturation ovocytaire au moyen d'astérosaponines, toxines produites par l'étoile de mer, et qui interagissent avec les molécules de cholestérol membranaire.

La maturation ovocytaire peut être induite chez le xénope par un grand nombre de stéroïdes non estrogéniques (voir pour revue MASUI et CLARKE, 1979 ; DESHPANDE et KOIDE, 1985), ainsi que par certains peptides tel que l'insuline (EL ETR et al., 1980 ; MALLER et KOONTZ, 1981 ; LESSMAN et SCHUETZ, 1981). Malgré les similitudes évoquées précédemment, entre le mode d'action général des hormones peptidiques et celui de la progestérone, il semble que la reprise de la méiose induite par l'insuline ou par les stéroïdes, ne découle pas des mêmes mécanismes cellulaires :

- Il a été montré que l'insuline, comme la progestérone, inhibait l'adénylate cyclase ovocytaire, mais que contrairement aux stéroïdes, elle agissait également sur l'activité phosphodiesterase de l'ovocyte (SADLER et MALLER, 1987).

- Il semble que la progestérone et l'insuline ne mettent pas en jeu les mêmes protéines de transduction :

Classiquement en effet, la stimulation de l'adénylate cyclase passe par le couplage du récepteur et de l'enzyme via une protéine Gs (protéine de liaison du GTP ou "guanine nucleotide-binding protein"), son inhibition par un couplage via une protéine Gi (RODBELL, 1980). La toxine de *Bordetella pertussis* empêche ce type d'inhibition en provoquant l'ADP-ribosylation de la protéine Gi (KATADA et UI, 1982 ; HILDEBRANDT et al., 1983). L'inhibition de l'adénylate cyclase ovocytaire par la progestérone n'est pas modifiée par l'utilisation de cette toxine (OLATE et al., 1984 ; SADLER et al., 1984 ; MULNER et al., 1985), et passe donc par un autre type de mécanisme. SADLER et MALER (1983) puis JORDANA et collaborateurs (1984) ont montré que la progestérone agissait sur la cyclase en diminuant le taux de renouvellement du GDP sur la protéine Gs.

L'inhibition de la cyclase lors du traitement de cellules somatiques de rat par de l'insuline n'est pas non plus bloquée par la toxine de Bordetella pertussis (GAWLER et al., 1987). Il semblerait dans ce cas, que l'inhibition de l'adénylate cyclase mette en jeu une protéine G d'un type nouveau, ou Gins. La nature de cette nouvelle protéine n'est pas connue actuellement mais elle pourrait être apparentée au produit de l'oncogène ras p21. Chez le xénope en effet, la micro injection de cette protéine ras p21 mime l'effet de l'insuline en provoquant la maturation des ovocytes (BIRCHMEIER et al., 1985 ; DESHPANDE et KUNG, 1987). La micro injection d'un anticorps monoclonal anti-protéine ras p21, inhibe l'induction de la maturation par l'insuline (DESHPANDE et KUNG, 1987 ; KORN et al., 1987) mais n'a pas d'effet sur l'action de la progestérone.

En d'autres termes, progestérone et insuline auraient des mécanismes d'action (ou de transduction) spécifiques, la progestérone en agissant directement sur la sous-unité Gs, l'insuline en activant une sous-unité Gins/ras.

Les facteurs de croissance de type IGF-I provoquent aussi la reprise de la méiose (MALLER et KOONTZ, 1981 ; SADLER et MALLER, 1987), et agissent comme l'insuline sur l'adénylate cyclase et la phosphodiesterase ovocytaire. Il semblerait en fait que l'action de l'insuline sur l'ovocyte de xénope puisse être due à sa fixation de manière non-spécifique sur les récepteurs aux IGF-I (MALLER et KOONTZ, 1981 ; SADLER et MALLER, 1987).

Chez les poissons, l'insuline ne provoque pas la maturation des ovocytes, mais il semble qu'elle puisse potentialiser l'effet de la  $17\alpha 20\beta$ DHP (LESSMAN, 1985). Comme chez le Xénope son rôle lors de l'induction de la maturation reste donc à définir.

Les quelques études qui ont été entreprises chez les poissons laissent supposer, comme nous l'avons évoqué précédemment, que les mécanismes mis en jeu lors de l'induction de la maturation ovocytaire sont similaires à ceux décrits chez le Xénope. Nous nous sommes attachés à vérifier cette hypothèse chez la truite arc-en-ciel :

- D'une part en recherchant un effet inhibiteur des drogues agissant sur le métabolisme de l'AMPc. -

- D'autre part en examinant l'effet de la  $17\alpha,20\beta$ DHP sur les niveaux d'AMPc ovocytaires.

Ce dernier point nous a conduit à travailler sur des ovocytes entourés de leur follicule puis sur des ovocytes défollicularisés (dénudés) et par là même à examiner le rôle des cellules folliculaires dans le contrôle des niveaux d'AMPc ovocytaires.

## Matériels et Méthodes

# 1. GESTION DES ANIMAUX

Nous avons utilisé au cours de notre étude des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) âgées de 2 à 3 ans. Trois souches ont été mises à notre disposition, dont les périodes d'ovulation s'étendent de novembre à janvier pour les femelles dites "hivernales", de février à avril pour les "printanières", et d'août à octobre pour les "estivales".

Les animaux, transférés de leurs piscicultures d'origine au laboratoire un mois avant expérimentation, ont été stockés dans des bassins alimentés en eau recyclée à 12C (+/-1), sous photopériode contrôlée ajustée à la photopériode naturelle.

Une fois par semaine durant la période de reproduction, les animaux sont anesthésiés par un mélange eau-phénoxyéthanol 03 pour mille. Lorsque les femelles sont à un stade suffisamment avancé (fin de vitellogénèse), quelques follicules peuvent être détachés des ovaires par massage abdominal. Les ovocytes sont alors observés sous loupe binoculaire (X10) en lumière transmise.

Trois stades ont été distingués suivant la position de la vésicule germinative (JALABERT et FOSTIER, 1984) :

- Les ovocytes en fin de vitellogénèse (FV) dont la vésicule germinative (VG) n'est pas encore visible.

- Ceux dont la VG commence à apparaître comme une tache claire au sein d'une zone plus sombre de vitellus à la périphérie de l'ovocyte, et qui sont dit au stade VG+ (VG subpériphérique).

- Enfin les ovocytes au stade VG+ (VG périphérique), présentant une vésicule germinative au contour bien délimité, juste sous la membrane plasmique.

Les animaux retenus pour expérimentation ont été isolés et sacrifiés le lendemain.

## **2. INCUBATIONS DE COURTES DUREES (48H.)**

### **2.1 Milieux**

Les milieux de dissection et d'incubation ont été adaptés de ceux mis au point au laboratoire par JALABERT et FOSTIER (1984) et se composent comme suit :

#### **b. Milieu de dissection (MD8/280)**

Pour approximativement 1 litre de milieu :

- NaCl : 7,7g
- KCl : 0.23g
- MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) : 0.07g
- MgCl<sub>2</sub>(6H<sub>2</sub>O) : 0.2g
- CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) : 0.5g
- Hepes (Sigma :H-3375) : 1,19g

Ces différents produits sont dilués dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est alors ajusté à 8 par NaOH (0,04 M). Enfin, la pression osmotique est ramenée à 280 mosmols par supplémentation en eau distillée. Le volume final est alors d'un litre environ.

#### **b. Milieu d'incubation (MI8/280)**

Sa préparation est identique à celle du milieu de dissection mais comprend une plus grande quantité d'Hepes (4,77g) et 1g de glucose.

## **2.2 Préparation des follicules**

Les femelles sélectionnées la veille en fonction de leur stade ovocytaire sont sacrifiées et saignées par ponction dans la veine caudale. Les ovaires sont prélevés et découpés en fragments de 2 à 7 follicules dans du ML8/280 à 4°C. Toutes les incubations ultérieures auront lieu dans une étuve à 12 °C sous agitation rotative permanente.

## **2.3. Appréciation de l'efficacité de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP sur la maturation**

La sensibilité ovocytaire à l'hormone maturante a été estimée in vitro comme décrite précédemment par JALABERT et al 1974 :

Les ovocytes (au sein ou non de leur follicule) sont incubés par lots de 25, dans des piluliers contenant 4 ml de MI8/280. Après 2 heures de préincubation, des solutions de 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP dans l'éthanol, (concentrations en progression géométrique de raison 0.5) sont ajoutées dans chaque pilulier. La concentration de l'éthanol dans les piluliers est alors de 0,25%. Le nombre de GVBD est estimé sous binoculaire après 48H d'incubation.

## **2.4. Efficacité des Substances Supposées inhiber la maturation ovocytaire**

Les ovocytes sont placés durant les 2 heures de préincubation dans du milieu contenant des concentrations variables des drogues à étudier. La 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP est alors rajoutée à une concentration (3.10<sup>-6</sup> M) suffisant à provoquer habituellement 100% de GVBD des ovocytes les moins sensibles (FV).

## **2.5. Dénudation**

### **a. Dénudation enzymatique**

La technique de dénudation employée a été adaptée de celle mise au point au laboratoire par JALABERT et HEYDORFF (résultats non publiés). Les follicules sont incubés par lots de 600 dans 20 ml de milieu de dénudation. Le milieu de dénudation est préparé à partir du M18/280 et contient :

- Collagénase : 10 $\mu$ g/g d'ovocytes
- Epinéphrine : 10 $\mu$ g/ml
- BSA : 2 mg/ml
- PVP : 2 mg/ml
- Sulfate de dextran : 1 mg/ml
- Héparine : 0,25mg/ml
- Acide hyaluronique : 0,05mg/ml

Après environ 10 h d'incubation, les ovocytes sont lavés abondamment avec du M18/280 à 4 °C et triés sous binoculaire. Seuls sont gardés les ovocytes totalement débarrassés de leur follicule et ne présentant pas d'anomalies apparentes du vitellus. Selon les animaux le rendement de cette technique peut varier de façon imprévisible, de 5 à 80%.

#### **b. Dénudation manuelle**

La dénudation manuelle des ovocytes, laborieuse et délicate, est effectuée sous binoculaire. Une très légère pression est exercée sur l'ovocyte afin d'amorcer son bourgeonnement à travers le follicule. L'ensemble épithélium ovarien, thèques et granulosa, peut-être alors déchiré et plus ou moins complètement séparé de l'ovocyte.

### **3. INCUBATIONS DE LONGUES DUREES (3 à 7.J.)**

#### **3.1. Milieux**

Les compositions des milieux de lavage et d'incubation sont les mêmes que lors des incubations de courtes durées, seuls des antibiotiques sont rajoutés au milieu d'incubation (pénicilline-streptomycine 100 U/ml ; kanamycine 100 µg/ml ; fungizone 250 µg/ml). Les différents milieux sont filtrés sur filtres "Milipore" stériles.

### **3.2. Préparation des follicules**

Les ovaires sont prélevés sous hotte à flux laminaire après désinfection de l'abdomen à l'Agrosepty1<sup>(1)</sup> et à l'alcool (65°). Les follicules sont individualisés et stockés dans le milieu de lavage à 4 °C. Les incubations ultérieures auront lieu dans un caisson stérile placé dans une étuve à 12 °C. L'ouverture du caisson et les prélèvements seront faits sous la hotte à flux laminaire.

(1) antiseptique à base de sels d'ammonium quaternaires : Sanofi Santé Animale.

## **4. MICROSCOPIE A BALAYAGE**

Les ovocytes sont plongés durant 3 h dans un liquide fixateur constitué de glutaraldéhyde (pH 7,4) dilué à 25% dans un tampon cacodylate 0,1 M (ajusté à 320 mosmol par du sucrose). Après un rinçage d'une heure dans le même tampon les ovocytes sont post-fixés par immersion d'une heure dans une solution de tétroxyde d'osmium 1 % dans le tampon cacodylate. Ils sont alors rincés dans ce même tampon et déshydratés dans des séries de solution d'acétone de concentrations croissantes. Ils sont ensuite conservés dans l'acétone 100% jusqu'à ce que soit effectuée une dernière déshydratation par la méthode du point critique. Enfin les échantillons sont métallisés à l'or, sous vide, avant observation au microscope à balayage.

## **5. ETUDE DES FLUCTUATIONS DES NIVEAUX D'AMPc OVOCYTAIRES**

### **5.1. Extraction de l'AMPc**

L'ensemble des opérations d'extraction et de dosage de l'AMPc (sauf précisions ultérieures) est effectué à 4°C. Cinq à 10 ovocytes sont prélevés, éventuellement dénudés rapidement lorsqu'il s'agit d'ovocytes entourés de leur follicule, et broyés au Potter dans un mélange extemporané de 5 ml d'HCl 04M et de 5 ml d'une solution d'EDTA 0,02 M contenant de la théophylline 2 mM (dans certains cas les ovocytes ont été pesés avant d'être broyés). Les échantillons sont centrifugés à 4000 g durant 15 mn. La phase intermédiaire est récupérée et traitée selon la méthode de MEURS et al., 1980 (passage à 100 °C durant 3 mn et neutralisation par CaCO<sub>3</sub>). Les échantillons sont stockés à -20 °C jusqu'au dosage. Le pourcentage de récupération de l'AMPc, estimé par addition d'AMPc tritié avant broyage, est d'environ 91 %.

### **5.2. Dosage de l'AMPc par liaison protéique**

Les dosages d'AMPc ont été réalisés par une technique de liaison protéique (MEURS et al., 1980). La protéine kinase A, utilisée comme protéine de liaison, a été extraite de tissus musculaires de lapin et purifiée selon la technique de GILMAN, 1970 modifiée par TOVEY et al., 1974. Le tampon utilisé (0,2M Tris-4mM EDTA) est fortement concentré en Tris [Tris(hydroxyméthyl)aminométhane] afin de compenser d'éventuelles disparités de neutralisation par le CaCO<sub>3</sub> et sachant que des concentrations plus importantes encore (5M) ne modifient pas les caractéristiques du dosage (TOVEY et al., 1974). La gamme d'étalonnage est préparée dans le même milieu que celui utilisé pour l'extraction de l'AMPc ovocytaire (ME : HCl-EDTA-Théophylline, neutraliser par CaCO<sub>3</sub>) ou éventuellement dans du ME dilué par le tampon de dosage (lorsque les concentrations en AMPc des échantillons nécessitent

également d'être diluées dans ce même tampon). Standards et, échantillons, AMPc tritié et protéine de liaison, d'un volume final de 300  $\mu$ l, sont incubés durant 2 h à 4°C. Les fractions libres et liées d'AMPc marqué sont séparées par addition d'un mélange de charbon actif (5 mg/ml), dextran (0,5 mg/ml), BSA (2mg/ml) dans le tampon Tris-HCl, et par prélèvement des surnageants après centrifugation (10 mn à 4000 g). Les coefficients de variation intra et inter dosage s'élèvent respectivement à 6,5% +/- 08 (SEM) et à 8,9%. Des échantillons provenant d'ovocytes dénudés, ainsi qu'un aliquote témoin d'AMPc non marqué, ont été traités par de la phosphodiesterase (1 unité/ml durant 30 mn à 37°C). Dans ces conditions, ce que l'on peut estimer comme étant la part "aspécifique" du dosage s'élève au maximum à 4%.

## 6 PRODUITS

- 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP (Stéroïdes)
- Acide hyaluronique (Sigma)
- AMPc (Sigma) -(3H)-AMPc (1,09 TBq/mmol) (Amersham)
- BSA (Sigma)
- Collagénase (Boehringer mannheim)
- db-AMPc (Sigma)
- Estradiol.17 $\beta$  (Stéroïdes)
- Forskoline (Calbiochem-Behring)
- Fungizone (Gibco)
- Héparine (Sigma)
- IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) (Sigma)

- Insuline bovine (Sigma)
- Kanamycine (Gibco)
- Pénicilline-Streptomycine (Gibco)
- Phosphodiesterase bovine 3',5'-cyclic nucleotide (Sigma)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP40) (Sigma)
- Sulfate de dextran (Sigma)
- Testostérone (Stéroïdes)
- Théophylline (1,3-diméthylxanthine) (Sigma)
- Toxine cholérique (Sigma)

## **7. ANALYSES STATISTIQUES**

Tous les points expérimentaux reportés sur les figures représentent (sauf précisions ultérieures) des moyennes (+/- sd) de 3 valeurs. Selon les cas, les comparaisons entre traitements ont été effectuées, soit par analyse de variance à 1 ou 2 facteurs suivies des tests de Tuckey ou de la PPDS (plus petite différence significative), soit par des tests t de Student, soit par des test non paramétriques lorsque la distribution des variables le justifiait.

L'AMPc joue-t-il un rôle dans le déclenchement de la maturation  
ovocytaire ?

Expérimentation sur ovocytes intrafolliculaires

## I - INTRODUCTION

Chez les amphibiens il avait été montré que l'augmentation artificielle de l'AMPc ovocytaire inhibait la reprise de la méiose, et que l'induction de la maturation s'accompagnait d'une chute des niveaux d'AMPc ovocytaires (voir pour revue MALLER et KREBS, 1980). Cherchant à savoir si les mécanismes mis en jeu lors de l'induction de la maturation étaient identiques chez la truite arc-en-ciel et chez le xénope, nous avons repris certaines des expériences qui avaient permis d'aboutir à ces résultats chez les amphibiens. La dénudation des ovocytes de truite arc-en-ciel étant délicate, nous avons commencé par travailler avec des ovocytes incubés dans leur follicules.

Dans un premier temps nous avons tenté, comme cela avait été fait chez le Xénope, de mettre en évidence chez la truite un effet inhibiteur des substances supposées augmenter l'AMPc ovocytaire.

Par la suite nous avons cherché à visualiser une éventuelle diminution du nucléotide dans l'ovocyte au cours du traitement par la  $17\alpha,20\beta$ DHP.

La fin du cycle ovarien s'accompagnant d'une augmentation de la sensibilité des ovocytes à l'hormone maturante (JALABERT et FOSTIER, 1984) nous avons voulu savoir si des variations de l'AMPc ovocytaire existaient durant cette même période.

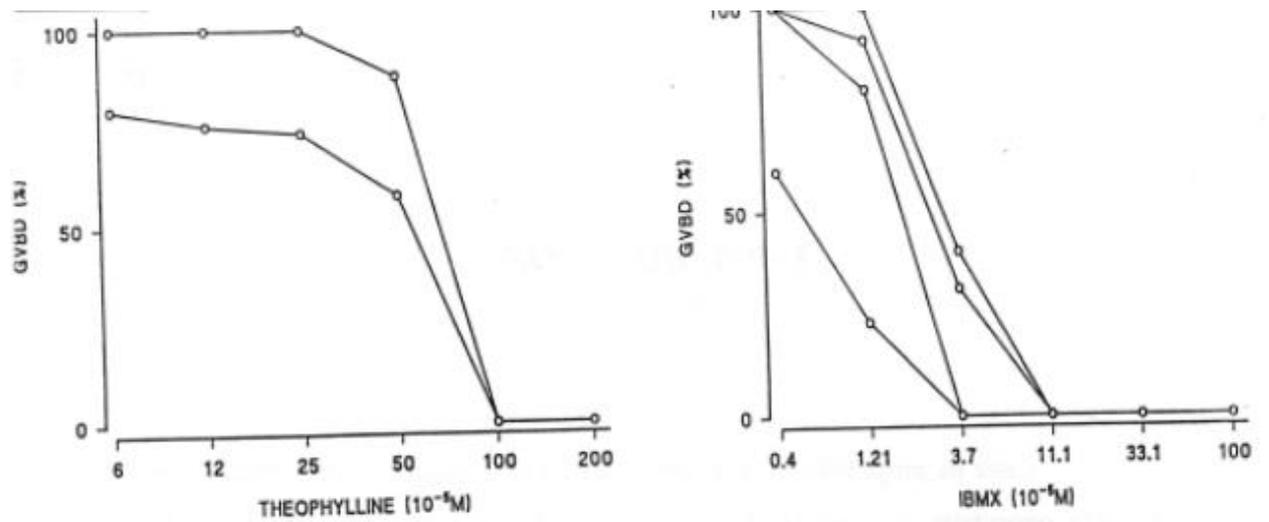


Fig 1. Effet de concentrations croissantes de théophylline ou d'IBMX sur le % de maturation (de GVBD) induit par la 17 $\alpha$ 20BDHP (3.10<sup>-6</sup>M). Tous les points d'une même courbe sont obtenus à partir d'ovocytes d'une seule femelle (25 ovocytes pour chaque concentration et chaque femelle).

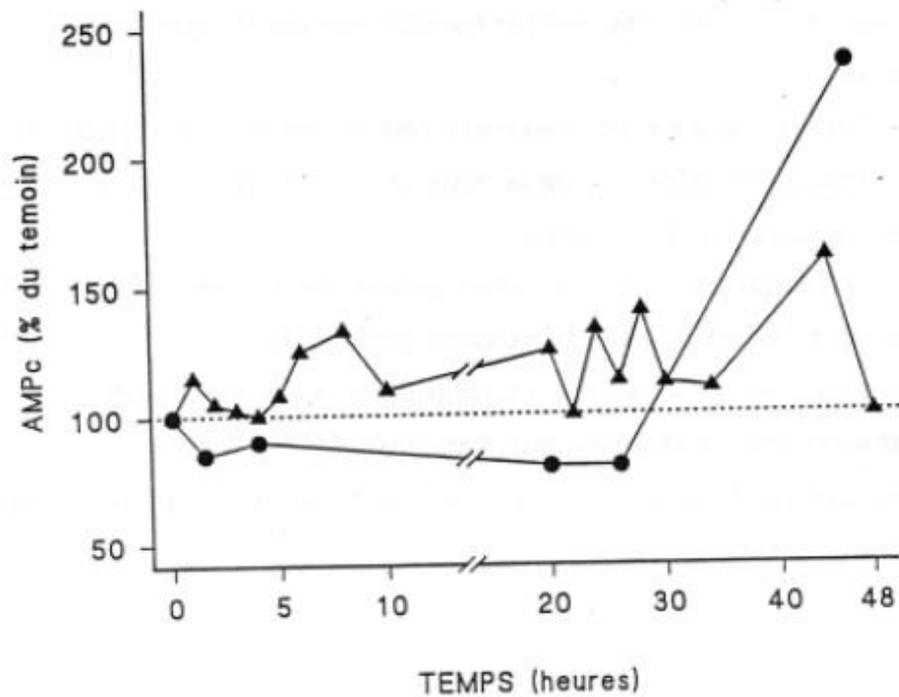


Fig 2. Effet de l'IBMX (10<sup>-3</sup>M) sur les niveaux d'AMPc ovocyttaire (exprimés en pourcentage du niveau d'AMPc ovocyttaire avant addition de l'IBMX). Les 2 courbes représentent les données obtenues à partir d'ovocytes de 2 femelles différentes. Chaque pourcentage est calculé à partir d'un prélèvement de 3 échantillons de 5 ovocytes.

## II – RESULTATS

### 1. INHIBITION DE LA MATURATION OVOCYTAIRE

#### 1.1. Effet de l'IBMX et de la théophylline

##### **a) Effet sur la maturation ovocytaire**

Les deux inhibiteurs de l'activité phosphodiesterase que nous avons utilisés (IBMX et théophylline), bloquent totalement l'action de la  $17\alpha,20\beta$ DHP sur la GVBD lorsqu'ils sont ajoutés dans le milieu d'incubation 2 h avant l'addition du stéroïde. Il semble toutefois que l'IBMX soit plus efficace que la théophylline, l'inhibition maximum des GVBD étant obtenue pour des concentrations de théophylline 10 fois supérieures à celles requises par l'IBMX (figure 1). L'effet de l'IBMX sur l'induction de la maturation nous a conduit à rechercher quel pouvait être son effet sur les niveaux d'AMPc ovocytaires

##### **b) Effet de l'IBMX sur les niveaux d'AMPc ovocytaire**

L'effet de l'IBMX a été testé sur 3 lots d'ovocytes provenant de 3 femelles différentes.

Lors de 2 de ces expériences de légères augmentations significatives de l'AMPc ovocytaire ont pu être mises en évidence dès la première heure d'incubation (respectivement 16 et 17% des niveaux de base).

Lors de la troisième expérience, l'augmentation de l'AMPc ovocytaire n'a pu être détectée qu'après 46 h d'incubation (les deux types de profil sont représentés sur la figure 2).

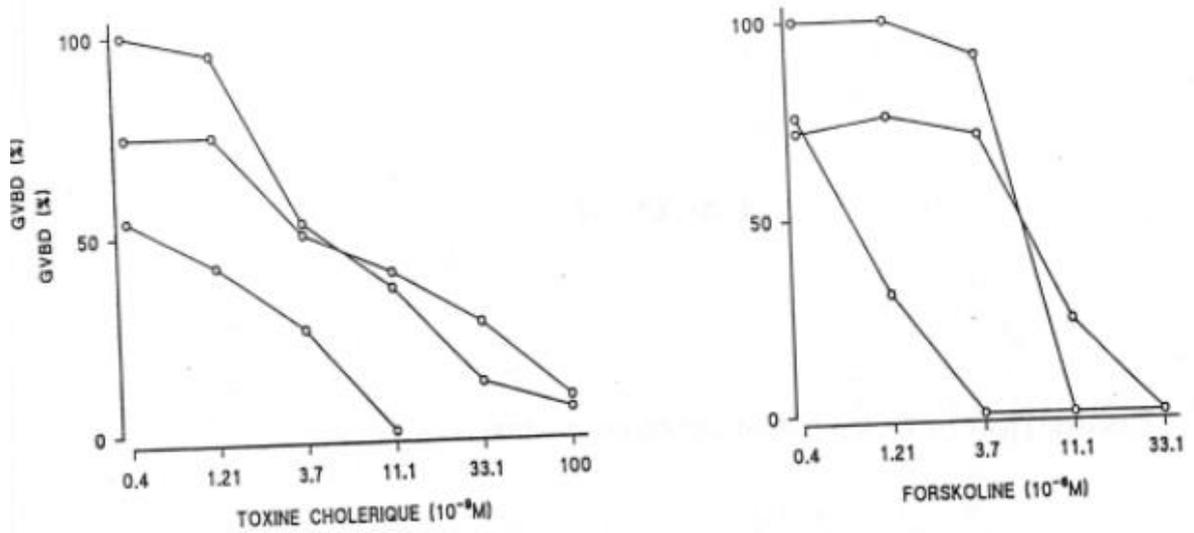


Fig 3. Effet de concentrations croissantes de toxine cholérique ou de forskoline sur le % de maturation induit par la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP (3.10<sup>-9</sup>M). Tous les points d'une même courbe sont obtenus à partir d'ovocytes d'une seule femelle (25 ovocytes pour chaque concentration et chaque femelle).

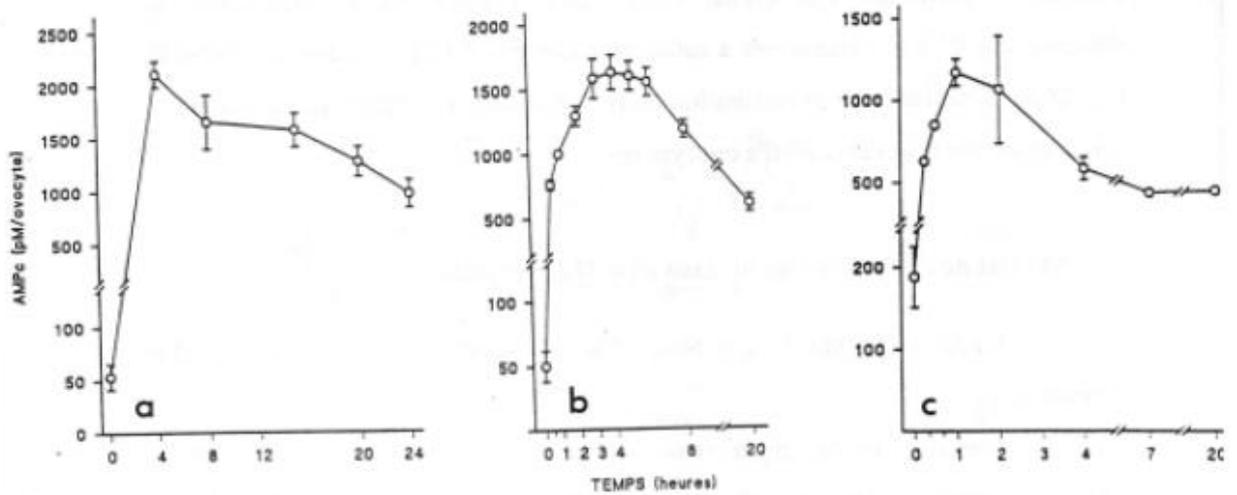


Fig 4. Effet de la forskoline (a et b : 50 $\mu$ M ; c : 10  $\mu$ M), associée à l'IBMX (10<sup>-3</sup>M) sur les niveaux d'AMPC ovocytaires, exprimé en pM/ovocyte. Les trois courbes représentent des données obtenues avec des ovocytes de 3 femelles différentes. Chaque point est la moyenne ( $\pm$  SD) d'un prélèvement de 3 échantillons de 5 ovocytes.

La faible amplitude et l'ambiguïté des réponses obtenues nous ont conduit à mener le même type d'étude avec des substances connues pour interférer dans la synthèse d'AMPc et non plus dans sa dégradation.

## **1.2. Effet de la toxine cholérique et de la forskoline**

### **a) Effet sur la maturation ovocytaire**

Les 2 substances supposées stimuler l'adénylate cyclase inhibent totalement l'induction de la maturation par la 17a20bDHP, pour des concentrations allant suivant les femelles, de 11 nM à plus de 100 nM pour la toxine cholérique, et de 3 à 33uM pour la forskoline (figure 3).

### **b) Effet de la forskoline sur les niveaux d'AMPc ovocytaires**

Les 3 expériences effectuées sur des ovocytes de 3 femelles différentes sont représentées sur la figure 4.

L'addition de forskoline associée à de l'IBMX au milieu d'incubation, provoque rapidement une accumulation considérable d'AMPc dans l'ovocyte :

- Lors de l'emploi de 50  $\mu$ M de forskoline les niveaux atteints après 30 mn représentaient plus de 15 fois le niveau de base (figure 4b) et suivant les femelles, jusqu'à 32 voire 39 fois le niveau de base après 4 h (figure 4a et 4b).

- Lorsque la forskoline est utilisée à plus faible concentration (figure 4c) son effet reste très important, et même si dans l'unique expérience réalisée le taux d'augmentation s'est avéré moins élevé que précédemment (6,5 fois le niveau de base), les concentrations atteintes en pM/ovocytes restent comparables à celles observées avec de plus fortes doses.

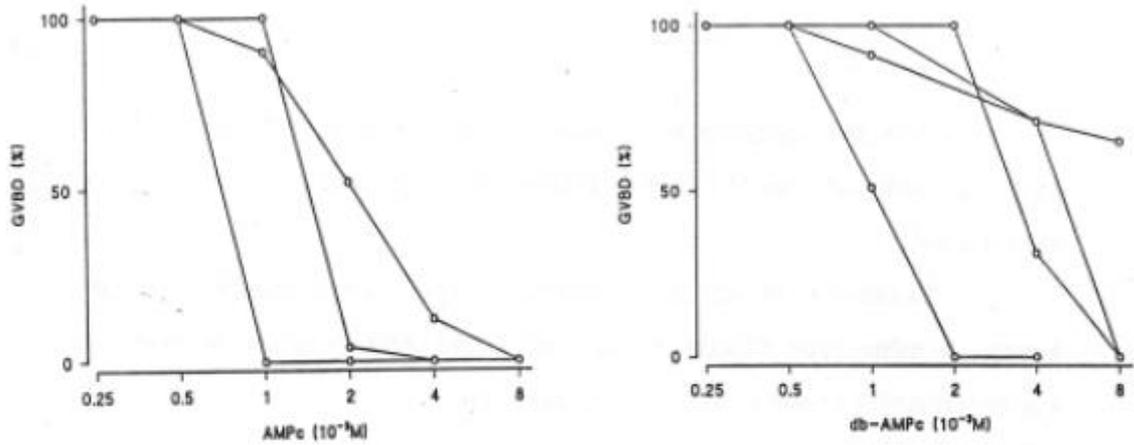


Fig 5. Effet de concentrations croissantes d'AMPc ou de db-AMPc sur le % de maturation induit par la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP (3.10<sup>-9</sup>M). Tous les points d'une même courbe sont obtenus à partir d'ovocytes d'une seule femelle (25 ovocytes pour chaque concentration et chaque femelle).

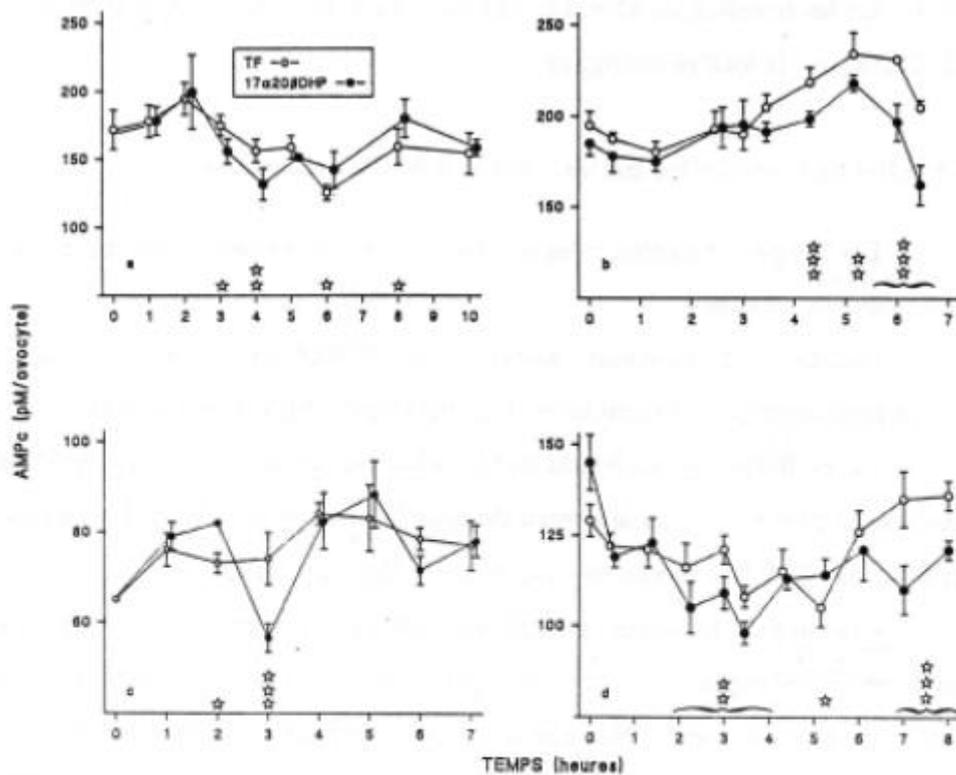


Fig 6. Evolution des niveaux d'AMPc d'ovocytes incubés dans leur follicule, en présence (●) ou non (○) de 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP 3.10<sup>-9</sup>M. A, b, c, d représentent des données obtenues à partir d'ovocytes de 4 femelles différentes. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  SEM) de 3 échantillons (pour la femelle a), ou de 5 échantillons (pour les femelles b, c, d) de chacun 10 ovocytes. Les différences significatives entre lots traités et témoins sont indiquées au dessus des temps d'incubations correspondants (☆: p < 0,05; ☆☆: p < 0,01; ☆☆☆: p < 0,001).

Dans tous les cas étudiés, après cette brutale augmentation, les concentrations en AMPc sont redescendues à des niveaux plus faibles sans pour autant atteindre les valeurs initiales, même après 20 h d'incubation.

Ces résultats nous ont conduit à rechercher un effet direct de l'AMPc sur la maturation ovocytaire.

### **1.3. Effet de l'AMPc Sur la maturation ovocytaire**

L'addition de l'AMPc, ou de son dérivé dibutyrique, dans le milieu d'incubation, bloque totalement l'induction de la GVBD par la  $17\alpha 20\beta$ DHP, le db-AMPc semblant moins efficace que l'AMPc lui-même (figure 5). Il n'a pas été possible, dans les limites des concentrations utilisées (8 mM), de bloquer la totalité de la réponse ovocytaire à l'hormone maturante, la clarification du vitellus subsistant malgré la présence des nucléotides dans le milieu.

## **2. FLUCTUATION DES NIVEAUX D'AMPc OVOCYTAIRES LORS DE L'INDUCTION DE LA MATURATION PAR LA $17\alpha 20\beta$ DHP**

### **2.1. En absence d'élévation préalable du niveau de base**

#### **a) Effet à court terme (moins d'une heure)**

L'adjonction de  $17\alpha 20\beta$ DHP dans le milieu d'incubation des ovocytes, ne provoque pas à court terme, de modification des niveaux d'AMPc ovocytaires. Des prélèvements ont été effectués après 30 sec., 1, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40 et 60 mn en

présence ou non de  $17\alpha,20\beta$ DHP sans qu'aucune différence n'ait pu être notée entre témoins et traités (données non représentées).

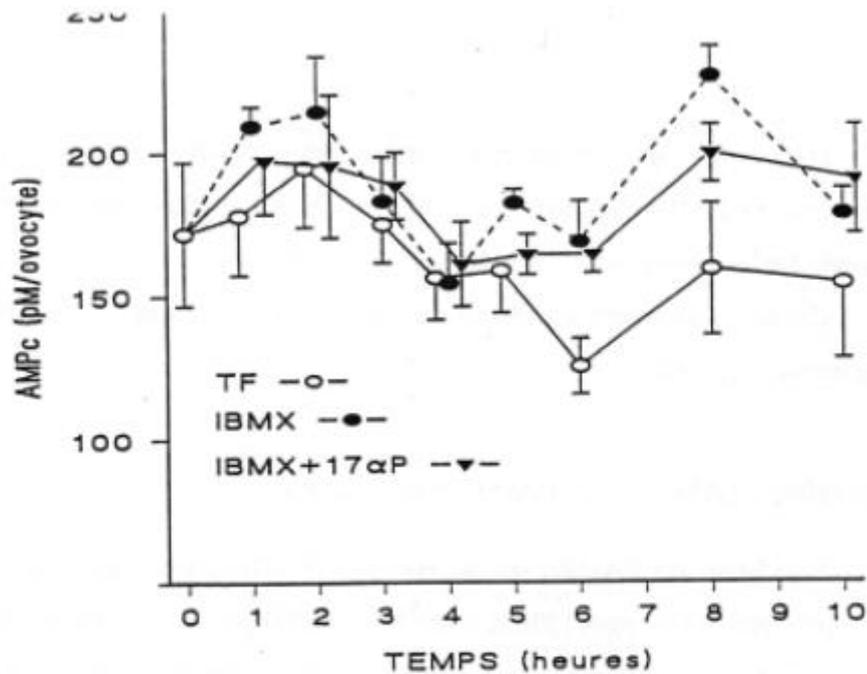


Fig 7. Effet de la 17α20βDHP sur les niveaux d'AMPc d'ovocytes incubés au sein de leur follicule en présence d'IBMX. Les ovocytes provenant d'une seule femelle sont incubés en boîtes de Pétri contenant respectivement du milieu d'incubation (O), de l'IBMX  $10^{-3}$ M (●), de l'IBMX et de la 17α20βDHP  $3 \cdot 10^{-6}$ M (▼). Chaque point de la cinétique représente la moyenne ( $\pm$  SD) de 3 échantillons de 5 ovocytes.

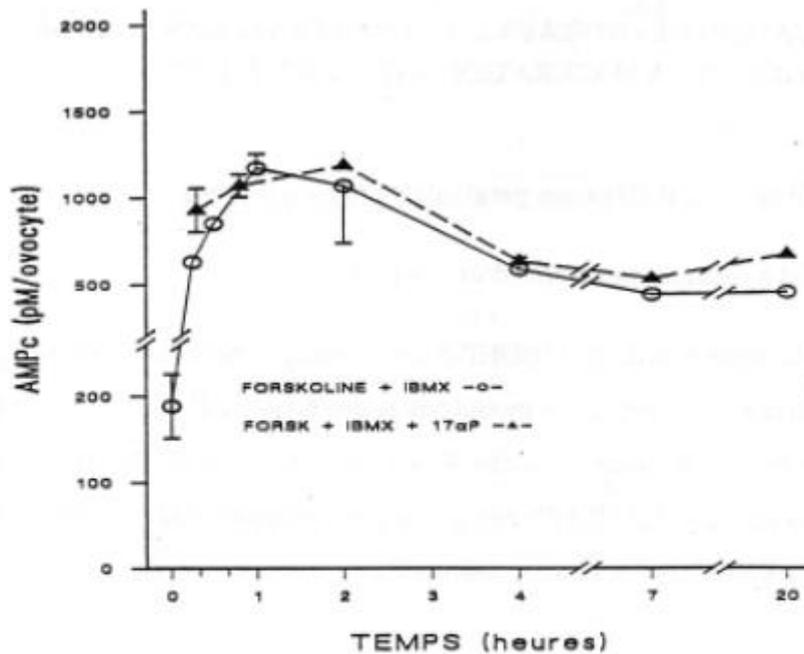


Fig 8. Effet de la 17α20βDHP sur les niveaux d'AMPc d'ovocytes incubés au sein de leur follicule en présence de forskoline. Les ovocytes sont incubés en présence de forskoline ( $10 \mu\text{M}$ ) et d'IBMX ( $10^{-3}$ M). La 17α20βDHP ( $3 \cdot 10^{-6}$ M) est ajouté dans le milieu d'un des lots d'ovocytes après 30 mn. d'incubation. Chaque point de la cinétique représente la moyenne ( $\pm$  SD) de 3 échantillons de 5 ovocytes.

b) Effet à plus long terme

Quatre expériences ont été menées sur différentes femelles en prolongeant les incubations des ovocytes durant 10 h (figure 6). Tous les lots d'ovocytes traités par la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP ont présenté des dépressions significatives des niveaux d'AMPc, d'amplitude et de cinétique extrêmement variables d'une femelle à l'autre. De même, ni la périodicité, ni l'amplitude des fluctuations des niveaux de base, enregistrées chez les témoins non traités, ne semblent comparables d'une expérience à l'autre.

## **2.2. Après élévation du niveau de base**

### **a) Effet de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP sur les niveaux d'AMPc lors du traitement des ovocytes par l'IBMX**

Les différences observées entre ovocytes traités par l'IBMX, seul ou associé à la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP, n'ont été significatives que dans l'une des 2 expériences réalisées (figure 7).

### **b) Effet de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP lors du traitement des ovocytes par la forskoline et l'IBMX**

L'addition de 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP dans le milieu d'incubation après un prétraitement des ovocytes à l'IBMX et à la forskoline ne provoque pas de dépression significative des niveaux d'AMPc (l'une des 3 expériences réalisées est représentée sur la figure 8)

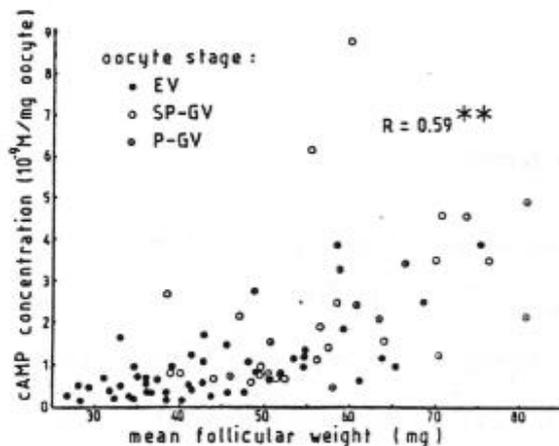


Fig 9. Correlation entre les concentrations intraovocytaires en AMPc et le poids ovocytaire moyen de femelles à différents stades. Chaque point correspond à un prélèvement de 10 ovocytes pour une femelle donnée. Le coefficient de corrélation  $R = 0,59$  est hautement significatif ( $p < 0,01$ ).

Stades	Nombre de Poissons	Moyenne	SD
FV	44	0,84	0,75
VG±	23	2,31*	2,09
VG+	12	2,05*	1,30

Tab 1. Comparaison de la concentration en AMPc (pmol/mg d'ovocyte) d'ovocytes de truite à différents stades. ☆ : différences significatives ( $p < 0,01$ ) entre le stade considéré et le stade FV.

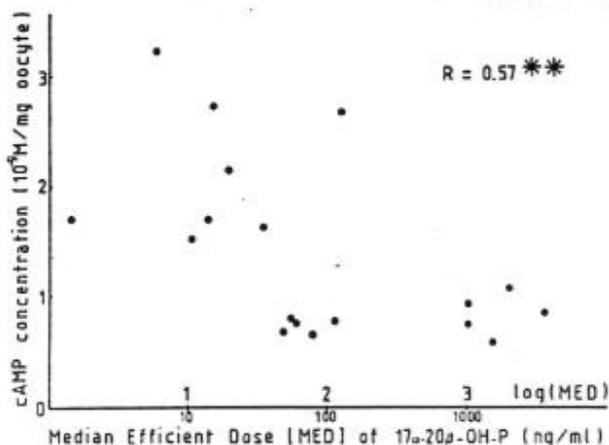


Fig 10. Correlation entre la concentration ovocytaire en AMPc, et la  $DE_{50}$  de la  $17\alpha 20\beta$ DHP pour l'induction des GVBD d'ovocytes provenant de plusieurs femelles. Le coefficient de corrélation  $R = -0,57$  est hautement significatif ( $p < 0,01$ ).

### **3. VARIATION DES NIVEAUX D'AMPc AUCOURS DE LA FIN DU CYCLE OVARIEN**

#### **3.1. Etude statistique**

Une dizaine d'ovocytes ont été prélevés par massage abdominal sur un grand nombre de femelles. Les stades, poids et contenus en AMPc des ovocytes ont alors été déterminés. Les résultats font apparaître que :

- Il existe une corrélation hautement significative entre les concentrations en AMPc et les poids ovocytaires (figure 9).

- Le contenu en AMPc des ovocytes au stade VG+/- ou VG+ est significativement plus important qu'au stade FV (tableau 1).

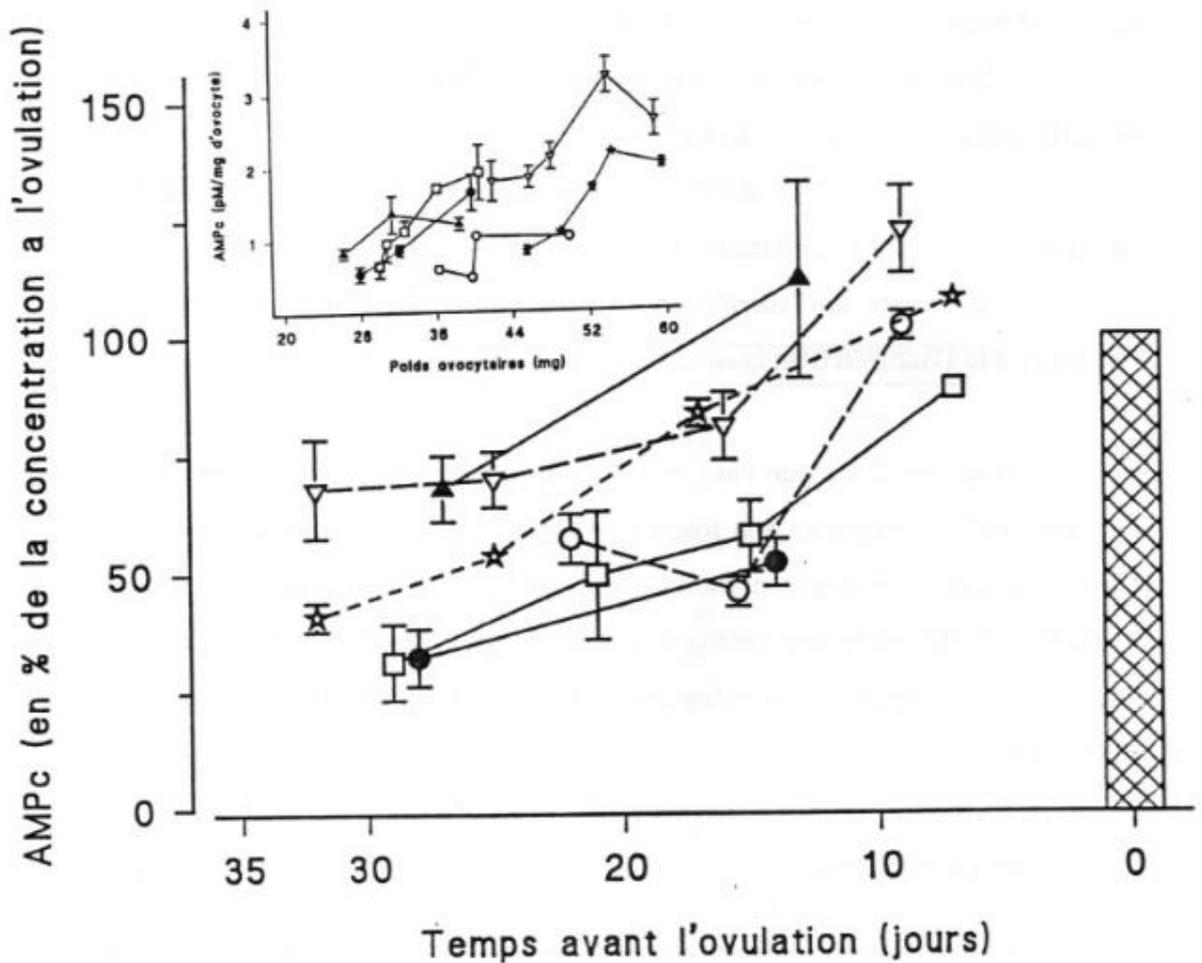
- Il existe une corrélation hautement significative entre la sensibilité ovocytaire à la  $17\alpha 20\beta$ DHP et la concentration des ovocytes en AMPc (figure 10).

Il semble donc que l'augmentation du poids ovocytaire lors de la fin du cycle ovarien s'accompagne à la fois d'une élévation de la concentration en AMPc des ovocytes, et d'une augmentation de leur sensibilité à l'hormone maturante. Ces résultats pouvant paraître surprenants si l'on admet que l'AMPc est inhibiteur de l'induction de la reprise de la méiose, nous avons tenté de les vérifier par des suivis individuels.

#### **3.2. Suivis individuels**

Une douzaine de femelles ont été marquées et prélevées régulièrement durant leur fin de cycle ovarien. Malgré de fortes différences, individuelles on constate comme précédemment, que la croissance ovocytaire se poursuit jusqu'à l'ovulation et

s'accompagne d'une augmentation de la concentration en AMPc des ovocytes. Les différents types de profils sont représentés sur la figure 11.



*Fig 11.* Evolution de la concentration ovocytaire en AMPc en fonction du temps avant l'ovulation. Pour chacune des femelles représentées (chaque courbe), des prélèvements de 10 à 15 ovocytes ont été effectués régulièrement durant la fin du cycle ovarien (du stade FV au stade VG<sup>+</sup>). Les ovocytes ont été dénudés rapidement, pesés par groupes de 5 et traités selon le protocole standard en vue du dosage de l'AMPc. La figure en surimpression représente pour les mêmes femelles, l'évolution de la concentration ovocytaire en AMPc en fonction du poids ovocytaire.

### III. DISCUSSION

Il semble d'après nos résultats, que l'induction de la maturation ovocytaire chez la truite arc-en-ciel ne puisse avoir lieu lorsque les concentrations intraovocytaires en AMPc sont augmentées artificiellement. Nous démontrons en effet que les inhibiteurs de l'activité phosphodiesterase, les substances stimulant l'adénylate cyclase, ou l'AMPc lui-même, bloquent totalement l'induction de la reprise de la méiose par la 17a20bDHP.

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'utilisation de théophylline ou d'IBMX sont en accord avec ceux rapportés chez l'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis* (GOETZ et HENNESSY, 1984 ; DEMANNO et GOETZ, 1987a), chez la perche canadienne, *Perca flavescens* (DEMANNO et GOETZ, 1987b) et chez les amphibiens (O'CONNOR et SMITH, 1976 ; MORRIL et al., 1977 ; BRAVO et al 1978).

Chez toutes ces espèces, l'inhibition complète de la maturation ovocytaire est obtenue pour des concentrations d'inhibiteur du même ordre de grandeur que celles que nous avons utilisées chez la truite arc-en-ciel (1 mM).

Toutefois, les méthylxanthines telles que l'IBMX ou la théophylline n'agissant pas uniquement sur l'activité phosphodiesterase (voir pour revue WELLS et KRAMER, 1981 ; SMITH, 1975), il n'est pas certain que l'inhibition de la maturation obtenue avec ce type de substances résulte exclusivement de leur action sur les niveaux d'AMPc ovocytaires. Il semble notamment que le blocage de la maturation qu'ils induisent puisse être, au moins partiellement, la conséquence d'une inhibition des synthèses protéiques de l'ovocyte. Chez le xénope il a été montré en effet que la théophylline diminuait fortement l'incorporation protéique des acides aminés (O'CONNOR et SMITH, 1976 ; BRAVO et al., 1978). De plus chez l'omble de fontaine (DEMANNO et

GOETZ, 1897) comme chez le xénope (BRAVO et al., 1978), la théophylline et les inhibiteurs de synthèse protéique sont capables de bloquer la reprise de la méiose, même lorsqu'elles sont ajoutées plusieurs heures après le stéroïde inducteur de la maturation. Les périodes durant lesquelles ces 2 types de produit conservent un effet inhibiteur sur la maturation sont identiques, ce qui laisse supposer que leurs modes d'action pourraient être les mêmes.

Nous avons montré que chez la truite arc-en-ciel, il était possible de bloquer la maturation ovocytaire par l'IBMX sans modifier les niveaux d'AMPc ovocytaires, ou en ne provoquant qu'une très faible augmentation de ceux-ci. Chez le xénope, alors que les méthylxanthines agissent effectivement sur l'activité phosphodiesterase (SADLER et MALLER 1987), la théophylline ou l'IBMX ne provoquent pas (ou peu) d'accumulation d'AMPc dans l'ovocyte (O'CONNOR et SMITH, 1976 ; BRAVO et al., 1978 ; MULNER, 1983). L'une des hypothèses avancées pour expliquer l'effet modéré de ces produits serait que la majeure partie de l'AMPc se trouverait dans l'ovocyte sous forme liée à la sous-unité R de la protéine kinase et donc peut être sous une forme non dégradée par les phosphodiesterases.

L'inhibition de la maturation par la forskoline semble plus démonstrative d'un effet via l'AMPc, aucun effet aspécifique n'ayant été rapporté jusqu'à présent. Nous démontrons d'autre part qu'un traitement par la forskoline provoque une accumulation rapide et considérable de l'AMPc ovocytaire.

Les mêmes types de résultats (inhibition de la maturation, augmentation rapide et très importante des niveaux d'AMPc) ont été obtenus chez l'omble de fontaine (DEMANNO et GOETZ, 1987).

Chez cette espèce comme chez la truite arc-en-ciel l'augmentation des niveaux d'AMPc n'est que transitoire. Malgré la présence continue de forskoline dans le milieu de culture, les concentrations en AMPc ne se stabilisent pas à leurs niveaux

maximums mais retombent après quelques heures à un niveau qui reste malgré tout supérieur aux concentrations initiales. Cette chute relative des niveaux d'AMPc pourrait être due au passage d'une partie de l'AMPc ovocytaire dans le milieu de culture ou au blocage imparfait des phosphodiésterases par l'IBMX, vraisemblablement associé à une diminution des synthèses d'AMPc par manque de précurseur (ATP). La réponse des cellules folliculaires lors des traitements par la forskoline pourrait également interférer avec la réponse de l'ovocyte lui-même. Il a été montré en effet chez *Oncorhynchus rhodurus* et chez *Oryzias latipes*, que la forskoline stimulait la production d'AMPc et la synthèse de  $17\alpha20\beta$ DHP par les cellules folliculaires (NAGAHAMA et al., 1985 ; IWAMATSU et al., 1987).

Lors des expériences que nous avons réalisées en présence de forskoline il est envisageable qu'une partie de l'AMPc ovocytaire provienne des cellules folliculaires, et que la  $17\alpha20\beta$ DHP produite par le follicule contrebalance l'effet de la forskoline en faisant rechuter les niveaux d'AMPc dans l'ovocyte. Ce dernier point nous semble peu probable puisque la chute relative des niveaux d'AMPc que nous enregistrons après traitement par la forskoline a également été observée en présence d'inhibiteurs de la stéroïdogénèse (résultats non représentés).

Enfin, en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'AMPc ovocytaire bloquerait l'induction de la maturation, nous démontrons que l'apport direct d'AMPc ou de db-AMPc dans le milieu de culture inhibe l'induction de la GVBD par la  $17\alpha20\beta$ DHP. Contrairement aux données rapportées chez les mammifères (MAGNUSSON et HILLENSJO, 1977) et chez les amphibiens (MORRIL et al., 1977) l'AMPc semble plus efficace que son dérivé dibutyrique. A l'inverse, la production folliculaire de  $17\alpha20\beta$ DHP chez la truite est davantage stimulée par le db-AMPc que par l'AMPc lui-même (FOSTIER non publié). Il est possible que lors des expériences d'inhibition de la maturation par les nucléotides cycliques, l'action du db-AMPc sur

l'ovocyte soit contrebalancée par la stimulation de la production de  $17\alpha 20\beta$ DHP par le follicule.

Ces premières expériences faites chez la truite arc-en-ciel, semblant confirmer, comme chez le xénope, que l'AMPc est inhibiteur de la maturation, nous nous sommes attachés à vérifier que l'induction de la reprise de la méiose s'accompagne d'une chute des niveaux d'AMPc ovocytaires. Les mesures d'AMPc que nous avons effectuées sur follicules entiers laissent supposer que la  $17\alpha 20\beta$ DHP est effectivement capable de faire chuter transitoirement les niveaux d'AMPc dans l'ovocyte de truite arc-en-ciel. Néanmoins les diminutions que nous avons enregistrées sont de faible amplitude (15% en moyenne), parfois à la limite de la signification et sans cinétique bien déterminée. Chez l'omble de fontaine et la perche canadienne, DEMANNO (1987) rapporte que seules 3 des 7 expériences effectuées ont permis de mettre en évidence une diminution des niveaux d'AMPc lors du traitement par la  $17\alpha 20\beta$ DHP. Les résultats obtenus chez ces 3 espèces se rapprochent de ceux rapportés chez les amphibiens. Chez le Xénope, les tentatives effectuées pour mettre en évidence une diminution des niveaux d'AMPc ovocytaires ont abouti à des résultats souvent contradictoires (voir pour revue CICIRELLI et SMITH, 1985). Il semble néanmoins que la progestérone provoque une diminution d'environ 20% de l'AMPc ovocytair (CICIRELLI et SMITH, 1985). La faible ampleur de la chute d'AMPc pourrait expliquer, tant chez les amphibiens que chez les poissons, les différences obtenues d'une expérience à l'autre.

L'ensemble de nos résultats confirme les données obtenues chez les amphibiens :

- L'élévation artificielle de l'AMPc ovocytair inhibe l'induction de la maturation par la  $17\alpha 20\beta$ DHP.

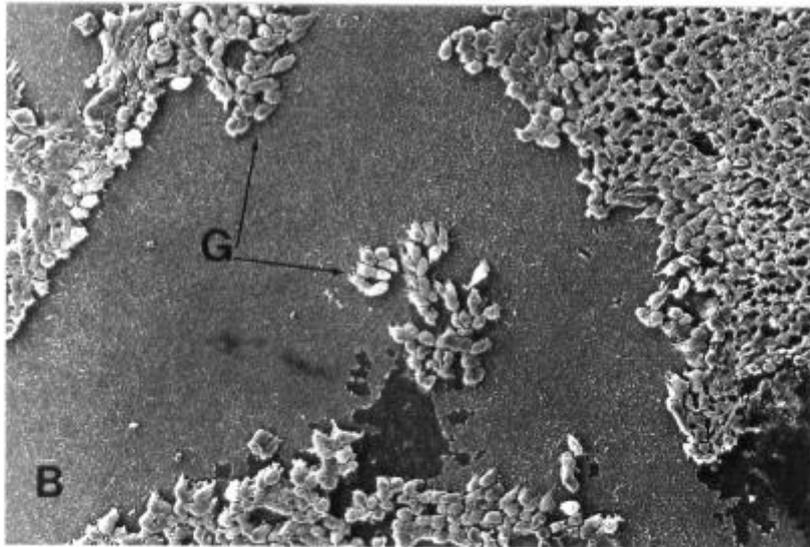
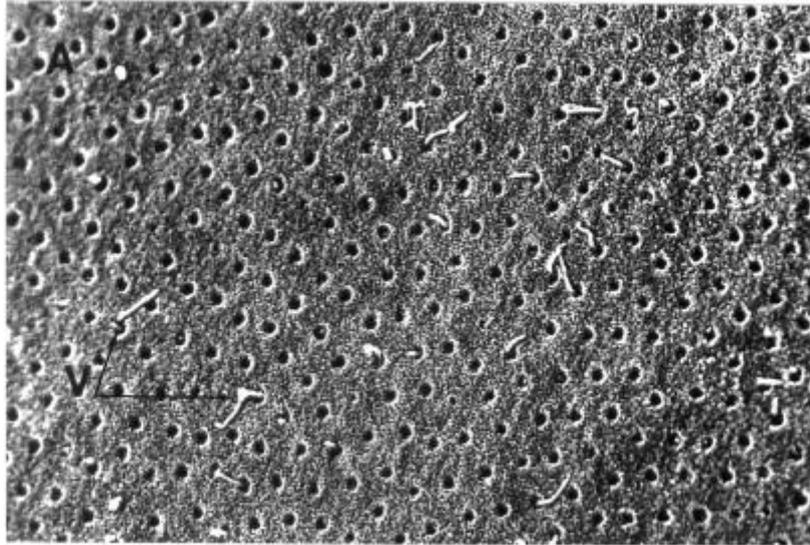
- La reprise de la méiose s'accompagne d'une chute de faible ampleur des niveaux d'AMPC.

Il semble donc vraisemblable que cette diminution des niveaux d'AMPC soit, comme chez les amphibiens, une condition nécessaire au déclenchement de la maturation.

Paradoxalement nos résultats montrent que la phase finale de la croissance ovocytaire et la migration de la vésicule germinative s'accompagnent à la fois d'une augmentation de la sensibilité des ovocytes à la  $17\alpha 20\beta$ DHP, et d'une augmentation des concentrations ovocytaires en AMPC (exprimées par mg d'ovocyte). Chez le xénope, les concentrations en AMPC (exprimées par unité de volume) restent stables entre les stades ovocytaires (DUMONT, 1972) II et VI (THIBIER et al., 1982). Pourtant chez le Xénope comme chez la truite la quantité totale d'AMPC par ovocyte augmente durant la fin de la période de croissance (THIBIER et al., 1982), ce qui, en première analyse, paraît incompatible avec l'effet inhibiteur de l'AMPC sur la maturation. Il faut toutefois remarquer que chez ces 2 espèces il s'agit de mesures globales de l'AMPC et non d'une estimation de l'évolution du nucléotide au sein des compartiments intracytoplasmiques incriminés lors de la maturation ovocytaire.

EFFET DE LA DEFOLLICULARISATION SUR LES NIVEAUX D'AMPc

INTRAOVOCYTAIRES



*Fig 12. Photographies en microscopie électronique à balayage d'ovocytes de truite arc-en-ciel. A : ovocyte dénudé par traitement enzymatique et présentant encore quelques microvilosités (V) folliculaires à sa surface (X4000). B : ovocyte dénudé manuellement (X200) sur lequel subsiste encore des cellules de granulosa (G).*

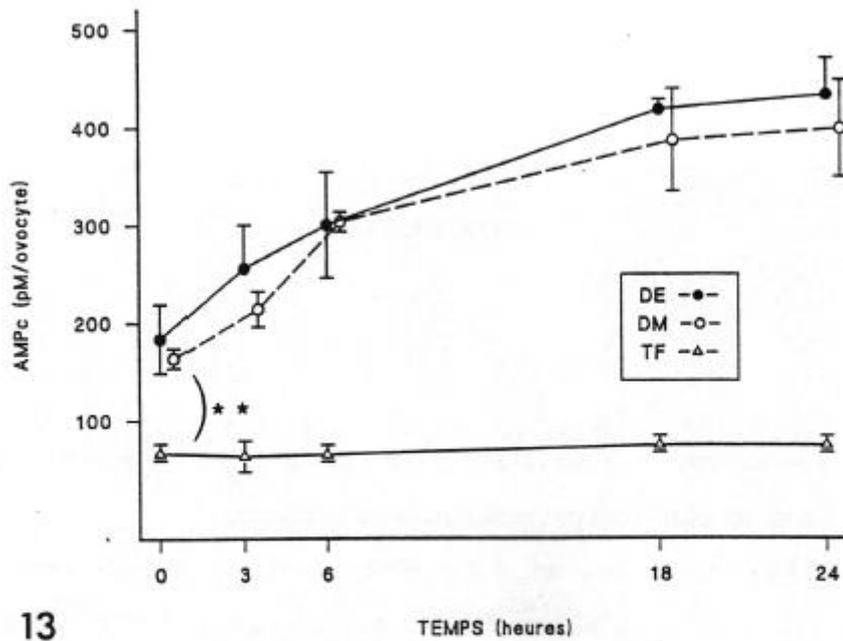
## I - INTRODUCTION

Les résultats que nous avons obtenus lors des expérimentations sur ovocytes non dénudés ne sont pas entièrement satisfaisants.

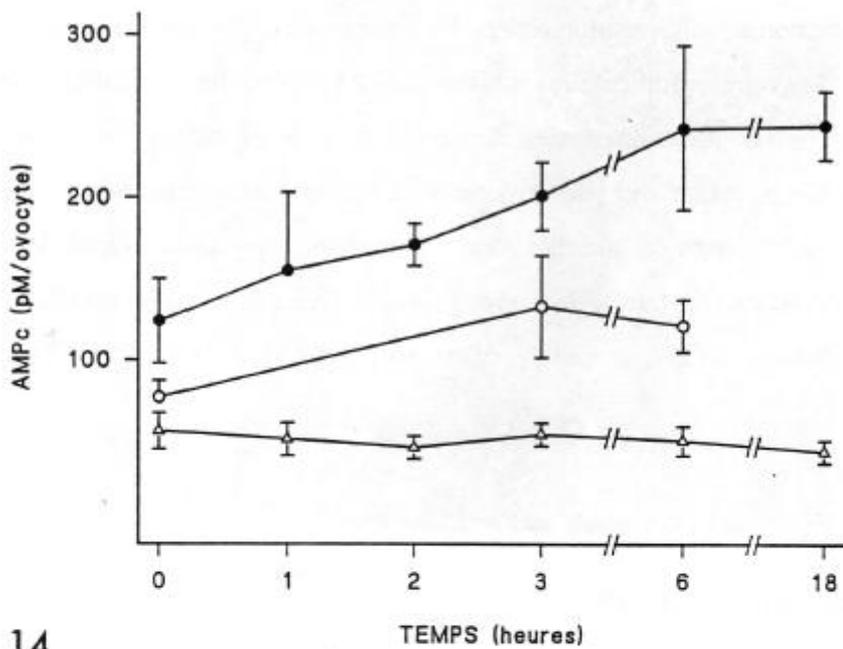
- Si de fortes concentrations d'AMPc inhibent effectivement la maturation, la cinétique et l'ampleur de la chute d'AMPc que provoque la 17a20bDHP ne sont pas reproductibles d'une expérience à l'autre.

- La nécessité d'une chute d'AMPc lors de l'induction de la maturation est en contradiction avec l'évolution de l'AMPc ovocytaire en fin de cycle ovarien.

Les cellules folliculaires pouvant être à l'origine des difficultés rencontrées pour caractériser les événements survenant lors de la maturation, nous avons entrepris de travailler sur des ovocytes défollicularisés (dénudés). Nous nous sommes attachés dans un premier temps à étudier l'effet de la dénudation sur les niveaux d'AMPc ovocytaires. Ceci nous a amené à nous interroger par la suite sur le rôle du follicule dans le maintien des niveaux de bases en AMPc des ovocytes.



13



14

Fig 13 et 14. Evolution de l'AMPc intraovocytaire après dénudation manuelle ( O ) ou enzymatique ( ● ) comparée à celle d'ovocytes non dénudés ( △ ). Chaque figure correspond à une femelle différente. Chaque point représente la moyenne du contenu en AMPc ( ± SD) de 3 échantillons de 5 ovocytes. Le point zéro de la cinétique correspond au premier prélèvement, les ovocytes ayant été dénudés quelques heures auparavant. Différences significatives entre traitements : (\*\*\*)  $p < 0,01$ .

## II. RESULTATS

### **1. DEFOLLICULARISATION**

Des ovocytes provenant de plusieurs femelles ont été dénudés enzymatiquement ou manuellement, puis observés en microscopie à balayage. Les ovocytes dénudés enzymatiquement ne présentent plus aucune cellule folliculaire à leur surface. Seules subsistent encore, par endroit, quelques microvillosités enchâssées à l'intérieur des pores de la *zona radiata* (figure 12a). Les ovocytes dénudés à la main présentent à leur surface des zones plus ou moins importantes recouvertes de cellules de granulosa. La plus grande partie des surfaces débarrassées de ces cellules folliculaires restent néanmoins recouvertes d'un tapis de microvillosités (figure 12b).

### **2. EFFET DE LA DENUATION SUR LE CONTENU DES OVOCYTES EN AMPc**

L'évolution des niveaux d'AMPc après dénudation a été suivie sur des ovocytes provenant de femelles de souches (printanière, estivale, hivernale) et de stades (FV, VGHE, VG\*) différents.

Dans tous les cas étudiés, la dénudation, qu'elle ait été manuelle ou enzymatique, s'est toujours traduite par une augmentation importante de l'AMPc ovocytaire.

Cette augmentation fut parfois significative dès le premier prélèvement (figure 13), c'est à dire après une nuit passée à 12 °C dans le milieu de dénudation (ovocytes dénudés enzymatiquement), ou d'incubation (ovocytes dénudés à la main), auquel s'ajoute le temps de préparation des ovocytes dénudés manuellement (environ 3 h à 4 °C), et 2h de préincubation à 12 °C.

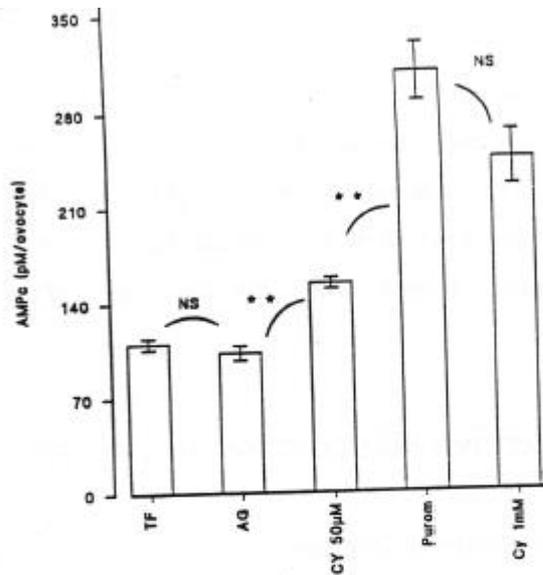


Fig 15. Effet de l'aminoglutéthimide (AG), de la cycloheximide (Cy) ou de la puromycine (Purom) sur l'AMPc d'ovocytes incubés au sein de leur follicule. Pour chaque traitement des échantillons de 3 fois 5 ovocytes ont été prélevés et rapidement dénudés juste avant leur broyage pour extraction de l'AMPc. Les résultats représentés sont les moyennes ( $\pm$  SD) des trois échantillons prélevés pour chaque traitement après 6 jours de culture en milieu stérile. Les témoins (TF) non traités par les inhibiteurs ont été incubés et prélevés dans les mêmes conditions expérimentales. Différences significatives entre traitements : \*\* $p < 0,01$ .

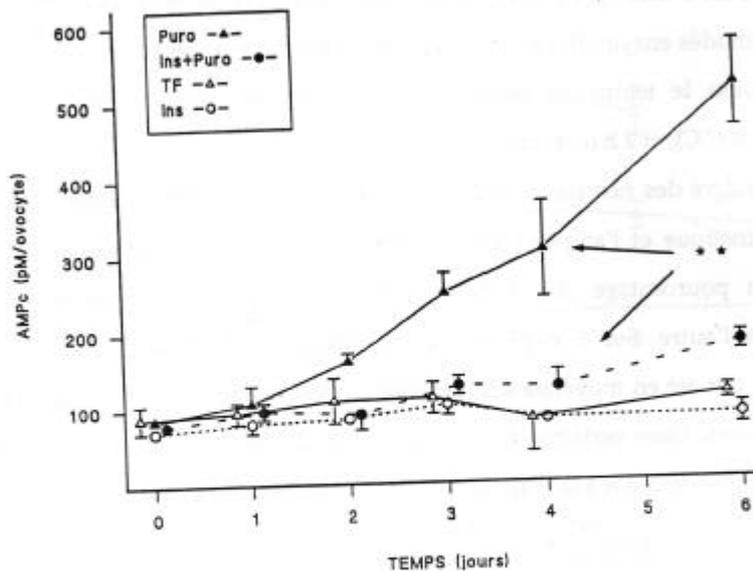


Fig 16. Effet de l'insuline (2 ui/ml) associée (●) ou non (○) à de la puromycine  $5 \cdot 10^{-5} M$ , sur les niveaux d'AMPc d'ovocytes incubés au sein de leur follicule. Tous les milieux (y compris celui des témoins non traités  $\Delta$ : TF) ont été renouvelés lors de chaque prélèvement. Chaque point est la moyenne ( $\pm$  SD) d'un prélèvement de 3 échantillons de 5 ovocytes. Différences significatives entre traitements : \*\* $p < 0,01$ .

Malgré des niveaux de base pouvant être très différents d'une femelle à l'autre, la cinétique et l'ampleur de l'accumulation de l'AMPc après dénudation (exprimé en pourcentage des témoins non dénudés) sont comparables d'une expérience à l'autre. Sur 9 expériences, les niveaux d'AMPc atteints après 6 h. d'incubation ont été en moyenne 45 fois plus élevés chez les ovocytes dénudés que chez les témoins. Dans certains cas l'accumulation d'AMPc a été moins importante chez les ovocytes dénudés à la main que chez ceux traités enzymatiquement (fig. 14).

### **3. INCUBATION D'OVOCYTES NON DENUDES EN PRESENCE D'INHIBITEURS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE OU STÉROÏDIENNE**

L'augmentation des niveaux d'AMPc qui suit la dénudation peut laisser penser qu'un ou plusieurs facteurs d'origine folliculaire (FIF ou facteur inhibiteur folliculaire), exerce(nt) un contrôle permanent sur la synthèse et/ou sur la dégradation de ce nucléotide dans l'ovocyte.

Il n'est pas exclu que les phénomènes enregistrés ne soient qu'artéfactuels, les dénudations enzymatiques ou manuelles pouvant porter atteinte à l'intégrité de la membrane ovocytaire et stimuler l'adénylate cyclase membranaire.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un contrôle de l'AMPc ovocytaire d'origine folliculaire, nous avons effectué des incubations d'ovocytes non dénudés, en présence d'inhibiteurs des synthèses protéiques et stéroïdiennes. L'évolution des niveaux d'AMPc a été suivie durant 6 jours, les milieux étant renouvelés lors de chaque prélèvement :

L'inhibition de la synthèse des stéroïdes par de l'aminoglutéthimide ne provoque aucune modification décelable des niveaux d'AMPc. Par contre, l'emploi de

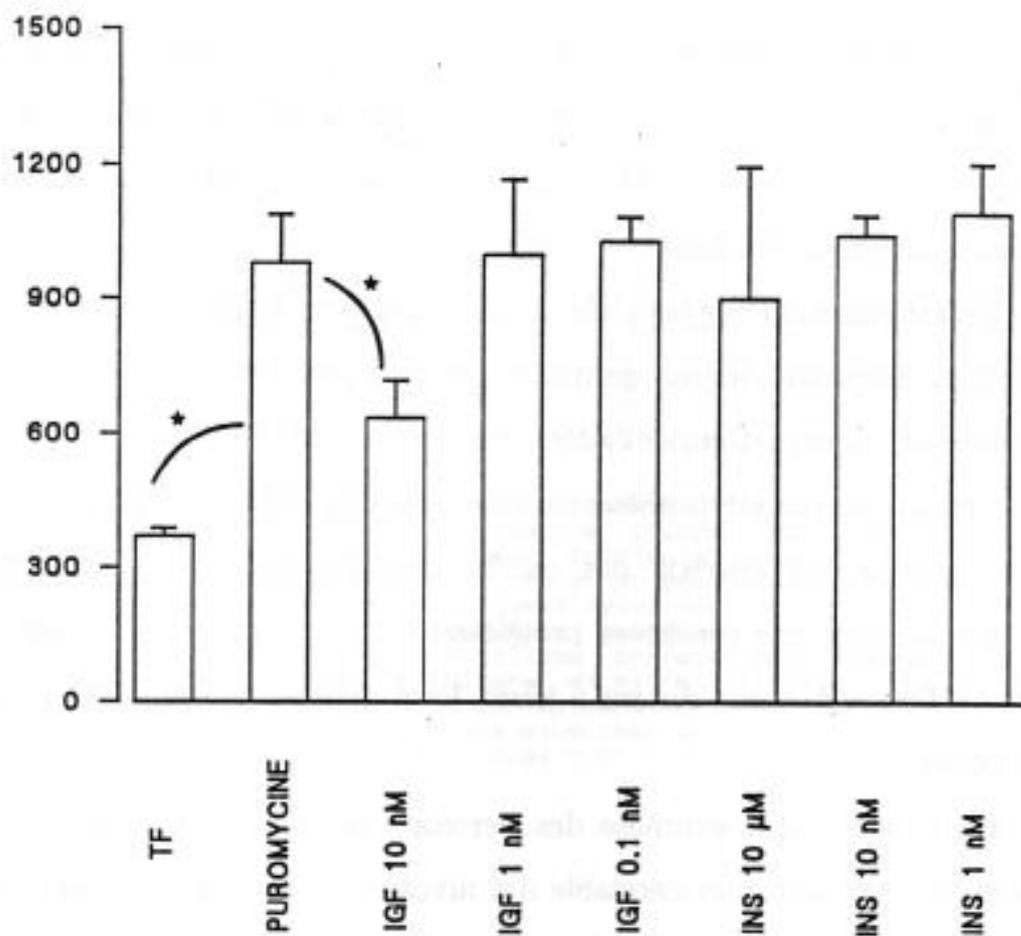


Fig 17. Effet de l'IGF<sub>1</sub> et de l'insuline sur les niveaux d'AMPc d'ovocytes incubés au sein de leur follicule en présence de puromycine ( $5 \cdot 10^{-6}M$ ). Différents lots d'ovocytes ont été incubés durant 6 jours dans des milieux de cultures contenant de la puromycine et de l'IGF<sub>1</sub> (IGF) ou de l'insuline (INS) à différentes concentrations. Deux lots ont servit de témoin, leurs milieux de culture n'étant supplémentés ni en insuline, ni en IGF et contenant ou non de la puromycine (TF). Différences significatives entre traitements : \* $p < 0,05$ .

cycloheximide, ou plus encore de puromycine, déclenche après 2 à 3 jours d'incubation une forte augmentation du contenu ovocytaire en AMPc, qui se poursuit durant toute la durée du traitement (figure 15).

#### **4. EFFET DE L'INSULINE SUR L'ACCUMULATION D'AMPc INDUITE PAR LES INHIBITEURS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE**

L'accumulation d'AMPc dans l'ovocyte sous l'effet de la puromycine ou de la cycloheximide suggère que le facteur inhibiteur folliculaire (FIF) est de nature protéique. Dans cette hypothèse, nous avons testé l'effet conjoint de la puromycine et de l'insuline et constaté que, dans 4 des 5 expériences réalisées, l'insuline bloquait totalement l'augmentation de l'AMPc ovocytaire lors de l'utilisation de la puromycine (figure 16). Lors de la 5<sup>ème</sup> expérience l'insuline n'a eu aucun effet significatif sur les niveaux d'AMPc (figure 17). Dans aucune des 5 expériences l'insuline (2  $\mu$ i/ml) n'a provoqué la maturation des ovocytes, même chez les témoins non traités par les inhibiteurs.

#### **5. EFFET DE L'IGF1 SUR L'ACCUMULATION D'AMPc INDUITE PAR LES INHIBITEURS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE**

Une seule expérience a été réalisée jusqu'ici et les résultats sont donc à prendre avec précaution. Il semble que l'IGF1 (10 nM) soit plus efficace que l'insuline à la même concentration ou à des concentrations supérieures (10  $\mu$ M) puisque, lors de cette expérience, l'insuline 10  $\mu$ M n'a pas eu d'effet sur l'AMPc ovocytaire (fig.17).

### III - DISCUSSION

Tous les travaux que nous avons présentés ici tendent à montrer qu'un ou plusieurs facteurs folliculaires (FIF) contrôlent en permanence les niveaux d'AMPc ovocytaires.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'un contrôle négatif de ce type et de cette importance est observé. Des travaux similaires aux nôtres ont été effectués chez 2 autres espèces de poissons, l'omble de fontaine et la perche canadienne (DEMANNO et GOETZ, 1987 ; DEMANO, 1987). Chez aucune de ces espèces il n'a été rapporté que la dénudation provoque une élévation importante des niveaux d'AMPc ovocytaires. Néanmoins, dans les 2 cas, il est fait mention d'une très légère augmentation des niveaux de base que les auteurs attribuent à la présence d'éthanol dans le milieu d'incubation (l'éthanol étant apporté lors du traitement par la 17a20bDHP a donc été rajouté chez les témoins).

Chez la truite nous n'avons pas constaté de différence entre témoins incubés ou non en présence d'éthanol (données non représentées). Il est possible que cette faible augmentation d'AMPc notée chez ces 2 autres espèces soit, comme chez la truite, le résultat d'une levée d'inhibition folliculaire, les 2 modèles ne se différenciant que par l'ampleur de l'accumulation d'AMPc qui en résulte.

Chez les amphibiens rien de tel n'a été montré. Alors que la maturation est induite, comme chez les poissons, par une stimulation stéroïdienne, la dénudation des ovocytes d'amphibiens ne provoque aucune modification apparente des niveaux d'AMPc ovocytaires.

Toutefois il semble que chez le xénope les cellules folliculaires puissent augmenter l'AMPc ovocytair, soit directement par le passage dans l'ovocyte de l'AMPc produit par le follicule, soit indirectement par l'intermédiaire des estrogènes

folliculaires capables d'augmenter les niveaux d'AMPc dans l'ovocyte (MULNER et OZON, 1981 ; THIBIER et al., 1982). Mais dans ce cas précis il s'agirait plus d'une modulation de l'effet de la progestérone sur la maturation que d'un contrôle permanent des niveaux d'AMPc ovocytaires.

Chez les mammifères, ou tout au moins chez le rat et la souris, il semble que la situation soit l'inverse de celle que nous observons chez la truite. En effet, la dénudation des ovocytes provoque à la fois la reprise de la méiose et la chute des niveaux d'AMPc ovocytaires (SCHULTZ et al., 1983 ; DECKEL, 1987).

L'une des hypothèses qui peut être avancée pour expliquer ce double phénomène serait qu'un facteur folliculaire, inhibiteur de la maturation (l'OMI ou "oocyte meiosis inhibitor"), contrôlerait positivement les niveaux d'AMPc ovocytaires. A notre connaissance, aucun travail n'est venu jusqu'à présent confirmer cette hypothèse. A l'inverse, il a été montré chez la brebis que l'AMPc ovocytair augmentait dans les premières heures qui suivent la mise en culture des follicules en présence de FSH et LH, puis rechetait au moment de la GVBD (MOOR et HESLOP, 1981). Toutefois les auteurs n'observent aucune variation des niveaux d'AMPc après dénudation des ovocytes, ce qui laisse supposer que cette augmentation serait plutôt la conséquence d'une stimulation par les hormones gonadotropes, que la levée d'une inhibition folliculaire.

Comme nous l'avons déjà évoqué, il n'est pas exclu que l'augmentation des niveaux d'AMPc enregistrée lors des expériences de dénudation soit artéfactuelle. Certains des composants du milieu de dénudation, tel que l'épinéphrine et la collagénase, sont en effet susceptibles de stimuler la synthèse d'AMPc (HANOUNE et al., 1982). D'autre part l'adénylate cyclase étant une enzyme membranaire, il est également possible qu'une stimulation mécanique de la membrane survenant lors de la dénudation manuelle, soit à l'origine de l'augmentation d'AMPc constatée. On peut

supposer néanmoins que dans cette hypothèse les niveaux d'AMPc seraient revenus plus ou moins rapidement à leurs niveaux d'origine, ce qui n'a jamais été le cas dans la limite des 18 voire 24 heures d'observation.

Si un facteur folliculaire contrôlait effectivement les niveaux d'AMPc ovocytaires quelle pourrait en être la nature ? Au moins deux types de composés pourraient éventuellement jouer ce rôle :

- Des stéroïdes qui chez la truite comme chez le Xénope semblent pouvoir modifier les niveaux d'AMPc dans l'ovocyte (chapitre précédent).

- Des peptides tels que l'insuline ou les facteurs de croissance. Chez le xénope en effet ceux-ci inhibent l'adénylate cyclase et stimulent les phosphodiesterases ovocytaires (SADLER et MALLER, 1987) ce qui devrait se traduire par une diminution des niveaux d'AMPc ovocytaires.

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'utilisation d'aminoglutéthimide, de cycloheximide et de puromycine confirment l'hypothèse de l'existence d'un FIF, et font penser qu'il pourrait s'agir d'une protéine ou d'un peptide. En effet, seuls les inhibiteurs de synthèse protéique provoquent la même accumulation d'AMPc que celle constatée lors des expériences de dénudation.

Nous référant aux travaux effectués chez le xénope nous avons testé l'effet de l'insuline et de l'IGF1 sur l'augmentation d'AMPc induite par la puromycine. Nous avons constaté qu'à forte concentration (10  $\mu$ M), l'insuline bloquait totalement l'effet des inhibiteurs de synthèse protéique, ce qui n'a pas été totalement le cas lors de l'utilisation de l'IGF1. Un certain nombre de données, obtenues tant chez les mammifères que chez les amphibiens, suggèrent pourtant que "l'insuline like growth factor 1" pourrait être le FIF mis en évidence lors des dénudations d'ovocytes :

- Chez la truite les niveaux d'AMPc restent stables lorsque les ovocytes entourés de leurs follicules sont incubés in vitro et en absence de tout apport hormonal extérieur. Ceci indique que les facteurs contrôlant l'AMPc ovocytaire sont d'origine folliculaire et non plasmatique. Or contrairement à l'insuline, l'IGF1 peut effectivement être synthétisé par des cellules de granulosa en culture (HAMMOND et al., 1985).

- Chez le xénope (SADLER et MALLER, 1987), les effets de l'IGF1 et de l'insuline sur l'ovocyte sont identiques (induction de la maturation, inhibition de l'adénylate cyclase, stimulation de la phosphodiesterase) L'insuline agirait sur l'ovocyte par l'intermédiaire des récepteurs à l'IGF1 (MALLER et KONTZ, 1981 ; SADLER et MALLER, 1987).

- Bien que n'ayant pas été entièrement concluants, nos résultats montrent que l'IGF1 est capable à de faibles concentrations (10 nM) d'agir sur les niveaux d'AMPc ovocytaires. L'efficacité de l'IGF1 pourrait être plus importante que celle de l'insuline.

L'ensemble de ces données nous incite à penser que l'IGF1 pourrait être l'un des facteurs contrôlant le niveau de base ovocytaire en AMPc.

Il est néanmoins possible que d'autres types de composés participent à ce contrôle. On ne peut exclure totalement que des stéroïdes interviennent à un moment ou à un autre pour réguler les niveaux d'AMPc de l'ovocyte (indépendamment du déclenchement de la maturation). En effet il n'est pas certain que dans nos conditions expérimentales l'emploi de l'aminoglutéthimide suffise à bloquer totalement la stéroïdogénèse, les faibles quantités de stéroïdes qui pourraient subsister suffiraient alors à empêcher la montée de l'AMPc dans l'ovocyte.

On peut également s'interroger sur la durée relativement longue (3 jours environ), nécessaire pour que commence l'augmentation de l'AMPc lors de traitements par les inhibiteurs :

- Correspond-elle au temps d'action de la puromycine, indispensable pour que toute trace d'un facteur tel que l'IGF disparaisse du follicule où il était synthétisé ?

- Témoigne t'elle d'inhibitions en cascade, intervenant soit au niveau du follicule soit même de l'ovocyte, et dont la montée des niveaux d'AMPc serait une des conséquences ? On peut en effet envisager que l'incubation prolongée en présence d'inhibiteurs des synthèses protéiques finisse par provoquer l'arrêt des synthèses des phosphodiesterases ovocytaires. L'élévation des niveaux d'AMPc ne serait alors en quelque sorte, que la manifestation d'un profond dérèglement du métabolisme ovocytaire.

Si l'on tient compte à la fois des résultats obtenus lors des dénudations d'ovocytes (augmentation des niveaux d'AMPc après quelques heures), et des observations faites lors de l'utilisation des inhibiteurs de synthèse protéique, l'hypothèse la plus probable reste qu'un facteur de type IGF produit par le follicule contrôle le niveau de base ovocytaire en AMPc. L'élimination de ce facteur lors des expériences de dénudation, ou le blocage de sa synthèse lors de l'emploi de puromycine se traduirait par une élévation de l'AMPc ovocytaire.

Dans cette hypothèse, la faible amplitude de l'augmentation de l'AMPc ovocytaire, survenant parfois lors de dénudations manuelles, s'expliquerait par la présence à la surface de l'ovocyte de zones plus ou moins importantes recouvertes de cellules de granulosa. Ces cellules, en continuant de produire le FIF, réduiraient la réponse de l'ovocyte. Ceci sous-entend que le FIF ne serait produit que par les cellules de granulosa et non par les cellules théquales ou par l'association thèque-granulosa.

UNE CHUTE DES NIVEAUX D'AMP<sub>c</sub> EST ELLE UNE CONDITION  
NECESSAIRE A LA REPRISE DE LA MEIOSE ?  
EXPERIMENTATION SUR OVOCYTES DEFOLLICULARISES

## I - INTRODUCTION

Chez le xénope le traitement des ovocytes par la toxine cholérique permet, en augmentant les niveaux d'AMPc, de mettre en évidence l'effet inhibiteur de la progestérone sur l'AMPc ovocytaire (THIBIER et al., 1982 ; SCHORDERET SLATKINE et al., 1982). En absence de cet artifice, les conséquences sur l'AMPc d'un traitement par la progestérone ne sont que très difficilement décelables, compte tenu de la faible ampleur des phénomènes à observer. Chez la truite, la dénudation des ovocytes nous a permis, d'une part, de faire abstraction de l'influence des cellules folliculaires sur l'ovocyte, et d'autre part, en augmentant les niveaux d'AMPc ovocytaire, de rendre possible la caractérisation de l'action de la  $17\alpha,20\beta$ DHP sur ce nucléotide.

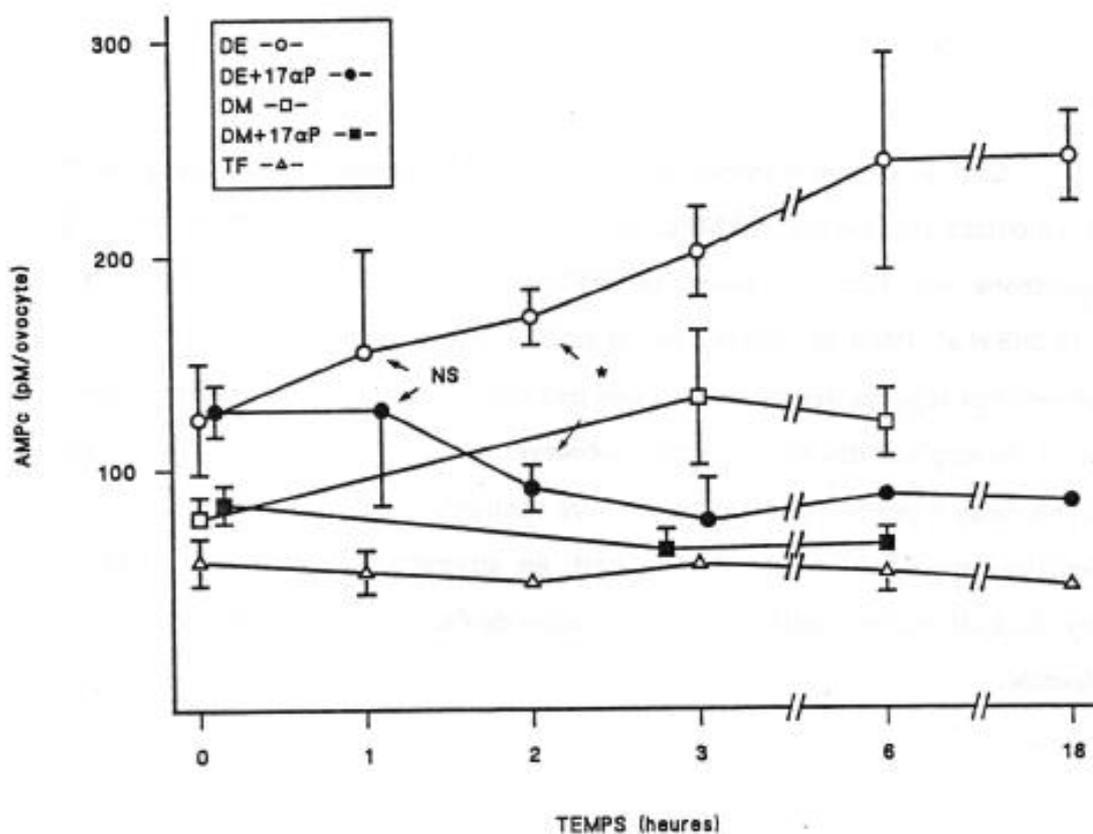


Fig 18. Effet de la 17α20BDHP sur l'accumulation d'AMPc d'ovocytes dénudés manuellement (□) ou enzymatiquement (○). Les ovocytes dénudés ont été incubés en présence (symboles pleins) ou non (symboles vides) de 17α20BDHP (10<sup>-6</sup>M). Certains ovocytes ayant servi de témoins (Δ) ont été incubés au sein de leur follicule, et ont été dénudés juste avant l'extraction de l'AMPc. Le point zéro fait référence à l'addition de la 17α20BDHP. Chaque point représente la moyenne (± SD) de trois échantillons de 5 ovocytes. Différences significatives entre traitements : p < 0,01 (\*); différences non significatives : NS.

### III - RESULTATS

#### 1 EFFET DE LA $17\alpha 20\beta$ DHP SUR LES OVOCYTES DENUDES

##### 1.1. Traitement continu par de la $17\alpha 20\beta$ DHP

###### a) Effet sur la maturation ovocytaire

L'addition de  $17\alpha 20\beta$ DHP au milieu de culture d'ovocytes dénudés, enzymatiquement ou manuellement, provoque leur maturation, malgré parfois une légère perte de sensibilité.

###### b) Effet sur les niveaux d'AMPc

Deux expériences ont été réalisées afin de détecter un effet précoce de la  $17\alpha 20\beta$ DHP ( $10^{-6}$  M). Les prélèvements des ovocytes ont été faits à 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 10 ; 15 ; 30 et 60 min et n'ont pas permis de révéler de différences entre les ovocytes traités ou non par la  $17\alpha 20\beta$ DHP (données non représentées). Par contre, lorsque les incubations sont poursuivies sur une plus longue période, on constate que la  $17\alpha 20\beta$ DHP ( $10^{-6}$ M) provoque une chute importante et prolongée des niveaux d'AMPc ovocytaires (figure 18). Comparée aux témoins cette chute est d'environ 40% après 6 h d'incubation, que les ovocytes aient été dénudés enzymatiquement ou manuellement. Les ovocytes traités par de la  $17\alpha 20\beta$ DHP reprennent normalement leur méiose, et ceci bien que leurs niveaux d'AMPc ne descendent jamais en dessous des niveaux mesurés chez les témoins non dénudés.

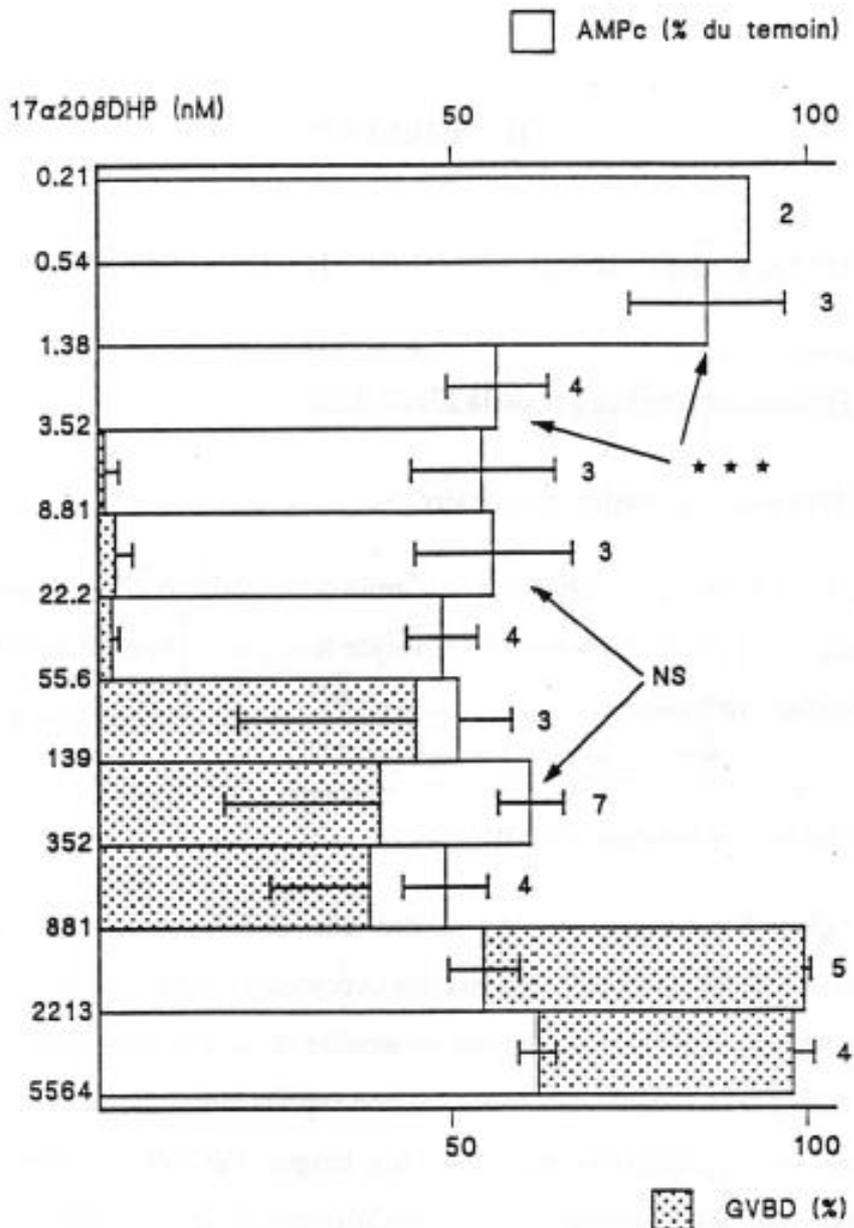


Fig 19. Effet de différentes concentrations de 17α20βDHP sur les niveaux d'AMPc et sur la reprise de la méiose (GVBD) d'ovocytes dénudés enzymatiquement. Les quantités d'AMPc mesurées chez les ovocytes traités par de la 17α20βDHP sont exprimées en pourcentage des niveaux d'AMPc mesurés chez les ovocytes témoins (incubés sans 17α20βDHP). Les prélèvements des ovocytes pour la mesure de niveaux d'AMPc ont été effectués après 6 h d'incubation. L'estimation du nombre d'ovocyte ayant repris leur méiose a été réalisée après 48 h d'incubation. Différences significatives entre traitements :\*\*\*p < 0,001; NS : différences non significatives. Les chiffres indiqués au dessus des histogrammes représentent le nombre d'expériences ayant servi à calculer les moyennes.

### **c) Effet doses-réponse**

Des concentrations très faibles de  $17\alpha20\beta$ DHP (1,4 à 55 nM) ne provoquent pas la maturation des ovocytes, mais sont capables de bloquer la montée de l'AMPc induite par la dénudation. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre les niveaux d'AMPc des ovocytes traités par des doses maturantes ou non maturantes de  $17\alpha20\beta$ DHP. Il ne semble pas exister de relation entre le pourcentage de maturation et l'importance de la chute de l'AMPc (figure 19). La perte de l'efficacité de la  $17\alpha20\beta$ DHP sur la stabilisation des niveaux d'AMPc est observée pour des concentrations variables suivant les femelles, comprises entre 1,4 et moins de 0,2 nM (figure 19).

## **1.2. Réversibilité des traitements**

### **a) Effet des fortes concentrations de $17\alpha20\beta$ DHP**

Le traitement par de la  $17\alpha20\beta$ DHP ( $3.10^{-6}$  M) durant 3 à 15 mn suffit à provoquer la reprise de la méiose d'ovocytes dénudés enzymatiquement. Nous n'avons pas constaté de différence entre les niveaux d'AMPc d'ovocytes traités temporairement ou en continu par de fortes concentrations de  $17\alpha20\beta$ DHP. Dans les 2 cas l'AMPc se maintient à un niveau bas durant toute la durée des prélèvements, même après un traitement de 3 mn seulement (figure 20). L'effet de la  $17\alpha20\beta$ DHP ( $3.10^{-6}$  M) semble irréversible, même lorsqu'elle est apportée puis retirée du milieu avant la dénudation. Toute stimulation n'en est pas pour autant impossible puisque l'adénylate cyclase reste sensible à la forskoline (figure 21).

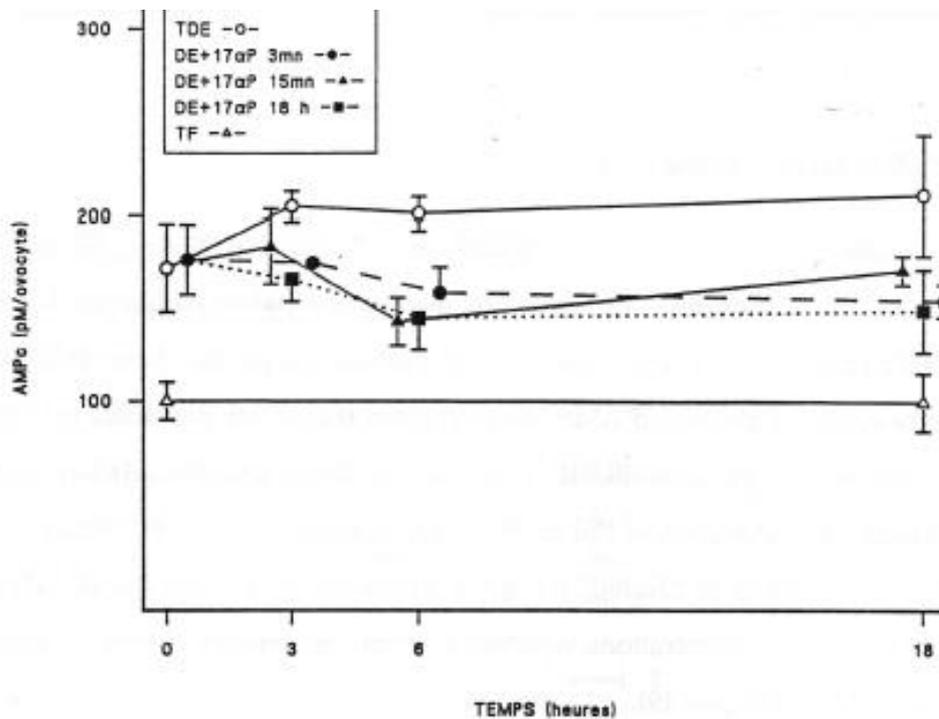


Fig 20. Effet d'un traitement par de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP appliqué durant de courtes durées et à fortes concentrations, sur les niveaux d'AMPc ovocytaires. Les ovocytes dénudés enzymatiquement ont été incubés 3 min (●), 15 min (▲), ou 18 h (■) en présence d'un excès de 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP ( $3 \cdot 10^{-6}$ M), puis lavés abondamment avec du ML8/280 et réincubés dans du milieu sans hormone durant 48 h afin d'estimer le nombre d'ovocytes ayant repris leur méiose. Ovocytes dénudés (○), ovocytes non dénudés incubés sans 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP (Δ). Les moyennes ( $\pm$ SD) représentées ont été calculées sur des échantillons de 3 lots 5 ovocytes.

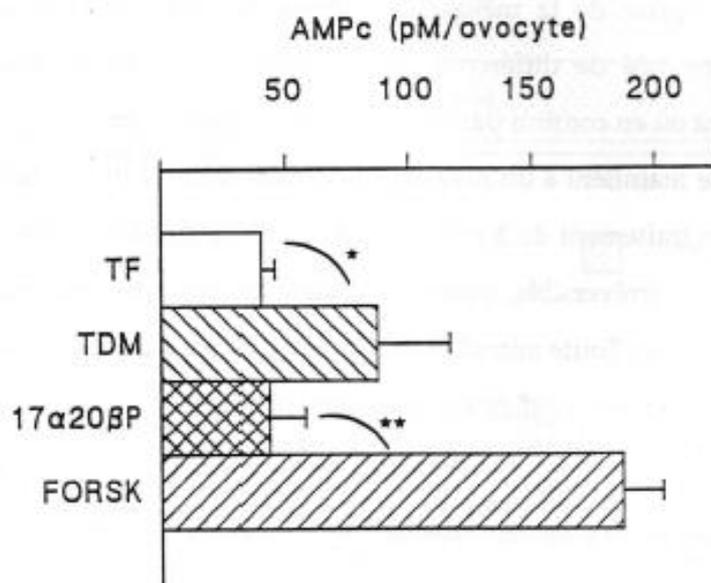


Fig 21. Effet de la dénudation, ou de la forskoline sur les niveaux d'AMPc d'ovocytes ayant été prétraités par de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP. Des ovocytes intrafolliculaires ont été incubés durant une heure dans du milieu M18/280 contenant de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP  $3 \cdot 10^{-6}$ M. Ils ont en suite été lavés abondamment (ML8/280), dénudés manuellement, et placés dans du milieu sans stéroïde contenant (Forsk) ou non (17 $\alpha$ 20 $\beta$ P) de la forskoline 50  $\mu$ M. TF : témoins n'ayant été ni préincubés avec de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP, ni dénudés. TDM témoins dénudés sans avoir été prétraité par de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP. Différences significatives entre traitements : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .

## **b) Effet des faibles concentrations**

L'effet de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP sur les niveaux d'AMPC est réversible lorsque le stéroïde est utilisé à de faibles concentrations. Le retrait du stéroïde se traduit par la remontée de l'AMPC ovocytaire, et ceci même lorsque le traitement préalable par la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP a été effectué durant plusieurs heures. Après 6 h d'incubation, les niveaux d'AMPC des ovocytes traités temporairement par de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP 3 ou 15 pM rejoignent les niveaux des ovocytes témoins dénudés (figure 22).

## **2. TRAITEMENTS PAR DES SUBSTANCES NON MATURANTES**

### **2.1. Effet des stéroïdes non maturants**

La testostérone n'est pas capable d'induire la reprise de méiose des ovocytes de truite arc-en-ciel. Aux 2 concentrations que nous avons utilisées, elle provoque par contre une diminution des niveaux d'AMPC (en pourcentage des témoins dénudés) identique à celle obtenue avec la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP (figure 23). Il en est de même pour la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone (17 $\alpha$ OHP) et la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ dihydroprogestérone, 2 autres stéroïdes non maturants proches de la 17 $\alpha$ 20 $\beta$ DHP (non représenté).

Enfin, l'estradiol 17 $\beta$  n'a aucun effet sur les niveaux d'AMPC des ovocytes, que ceux-ci soient au stade FV ou VG<sup>+</sup> (figure 23).

### **2.2. Effet de l'insuline**

L'insuline provoque également, lorsqu'elle est employée à fortes doses (figure 24), une diminution importante de l'AMPC ovocytaire (environ 50% après 6h d'incubation). En aucun cas elle n'a provoqué la maturation des ovocytes.

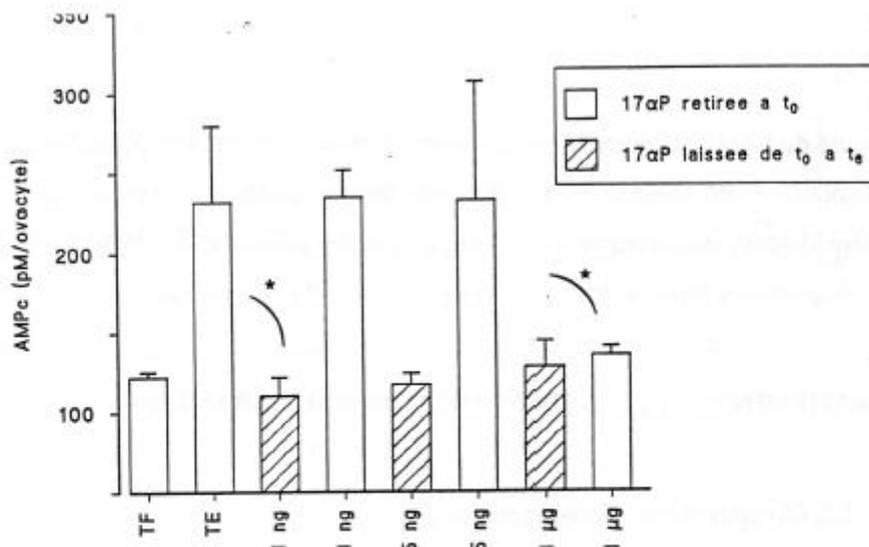


Fig 22. Effet des faibles concentrations de 17α20βDHP. Les ovocytes ont été dénudés par traitement enzymatique durant 10 h en présence de différentes concentrations de 17α20βDHP. Le stéroïde est ensuite retiré du milieu d'incubation. Les prélèvements des ovocytes (3 fois 5 ovocytes par concentration, moyennes ± SD) ont été effectués 6 h plus tard. \*p<0,05

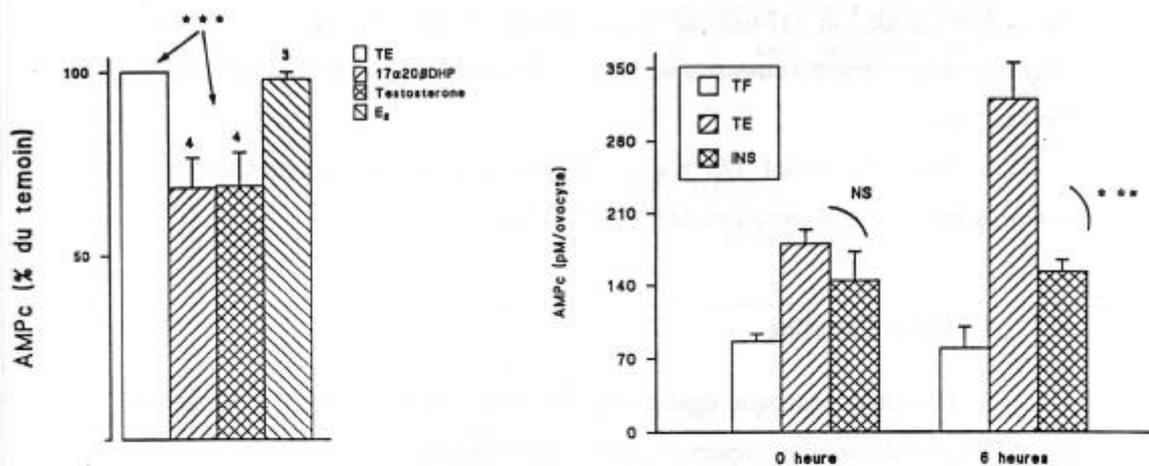


Fig 23. Effet comparé de la 17α20βDHP (17α20βP), de la testostérone (Testo), et de l'estradiol (E<sub>2</sub>), sur le contenu en AMPc d'ovocytes dénudés par traitement enzymatique (mesurés après 6 h d'incubation en présence des différentes hormones). Les valeurs sont exprimées en % (± SEM) des témoins dénudés, incubés sans stéroïde (TE). Les chiffres au dessus des histogrammes représentent le nombre d'expériences ayant été réalisées. Différences significatives entre les traitements : \*\*\*p<0,001.

Fig 24. Effet de l'insuline sur les niveaux d'AMPc d'ovocytes dénudés par traitement enzymatique. Les ovocytes sont dénudés puis traités durant 6 h par de l'insuline (2 u/ml). Chaque donnée représentée correspond à la moyenne (± SD) de trois échantillons de 5 ovocytes (provenant d'une seule femelle). Différences significatives entre traitements : (\*\*\*) : 0,001).

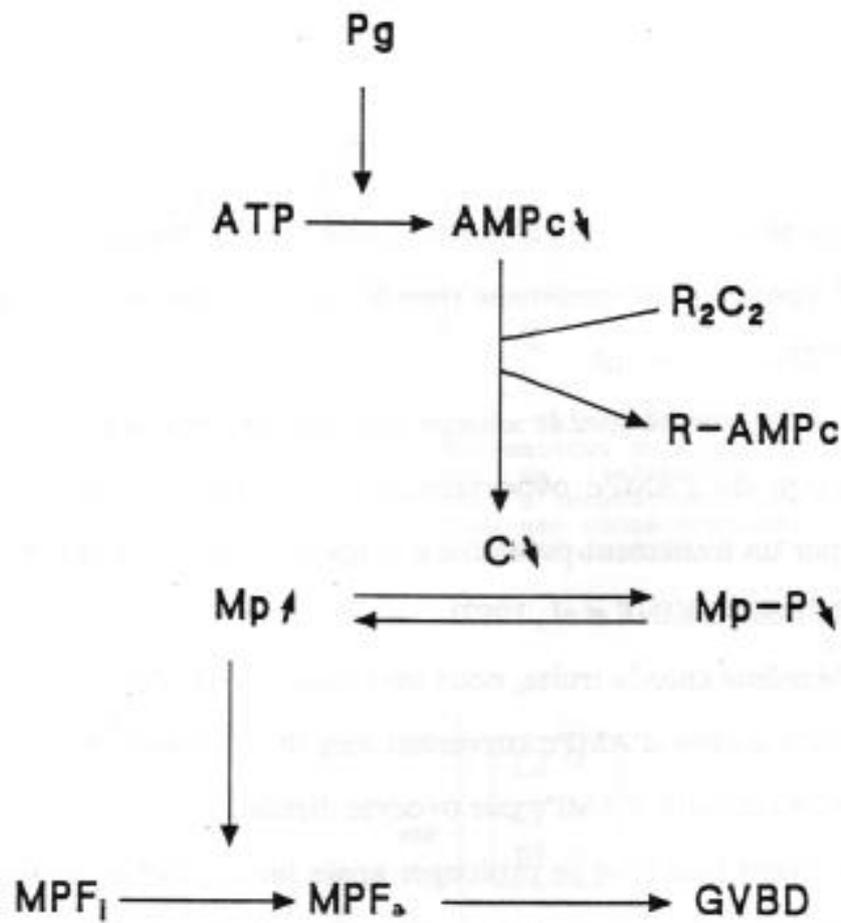
### III. DISCUSSION

Les résultats que nous avons présentés ici mettent en évidence que la  $17\alpha$ - $20\beta$ DHP, comme la progestérone chez les amphibiens, est capable d'agir sur les niveaux d'AMPc ovocytaires.

Il a été montré chez le xénope que la progestérone provoquait la chute de la concentration de l'AMPc ovocytaire lorsque celle-ci avait été artificiellement augmentée par un traitement préalable à la toxine cholérique (THIBIER et al., 1982 ; SCHORDERET-SLTKINE et al., 1982).

De même chez la truite, nous montrons que la  $17\alpha$ - $20\beta$ DHP est capable de bloquer l'accumulation d'AMPc survenant lors de la dénudation et de faire chuter durablement la quantité d'AMPc par ovocyte. Seules les concentrations importantes d'hormones voient leur effet se prolonger après leur retrait du milieu d'incubation. Cette prolongation de l'action du stéroïde pourrait être due à son accumulation à l'intérieur de l'ovocyte et, éventuellement, à son relargage progressif dans le milieu de culture.

Chez la truite, comme chez le xénope, la chute d'AMPc induite par le stéroïde en absence d'élévation préalable des niveaux de base est de faible ampleur, ce qui rend son observation difficilement reproductible. Le traitement des ovocytes par la toxine cholérique chez le xénope ou leur dénudation chez la truite permet l'amplification de la réponse aux stéroïdes maturants. Chez ces 2 espèces, l'estradiol, stéroïde n'induisant pas la reprise de la méiose, ne provoque pas non plus la chute des niveaux d'AMPc. En première analyse il semble pourtant que les similitudes entre les 2 modèles s'arrêtent là, puisque contrairement à ce qui a été montré chez les amphibiens la chute de la concentration ovocytaire en AMPc ne semble pas être une condition suffisante pour provoquer la reprise de la méiose des ovocytes de truite arc-en-ciel :



*Schéma 1.* Modèle de mécanisme d'action de la progestérone sur la reprise de la méiose ovocytaire. Pg : progestérone ; R<sub>2</sub>C<sub>2</sub> : protéine kinase AMPc-dépendante ; C : sous unité catalytique de cette protéine ; Mp-P et Mp : protéine de maturation phosphorylée ou non ; MPF<sub>1/2</sub> : facteur inducteur de la maturation (GVBD).

La dénudation des ovocytes, malgré l'augmentation des niveaux d'AMPc qu'elle provoque, ne bloque pas l'induction de la maturation par la  $17\alpha 20\beta$ DHP (tout au moins dans les premières heures qui suivent le début de l'augmentation d'AMPc). Le suivi des niveaux d'AMPc d'ovocytes dénudés et traités par la  $17\alpha 20\beta$ DHP indique pourtant que la concentration ovocytaire en AMPc reste toujours supérieure dans les ovocytes traités par ce stéroïde, aux niveaux mesurés chez les témoins intrafolliculaires (témoins non dénudés, non traités) qui eux ne murent pas.

Ceci va à l'encontre des mécanismes décrits classiquement chez le xénope où la chute des niveaux d'AMPc provoque la diminution des phosphorylations AMPc dépendantes, et par voie de conséquence l'apparition du MPF et la maturation de l'ovocyte (schéma 1). Selon cette hypothèse le déclenchement de la GVBD ne survient que lorsque les niveaux d'AMPc tombent en dessous d'une valeur seuil inférieure au niveau de base. Ainsi chez le xénope, lors d'un traitement par la toxine cholérique puis par la progestérone, cette valeur n'étant pas franchie, le stéroïde ne provoque pas la reprise de la méiose des ovocytes (THIBIER et al., 1982 ; SCHORDERET-SLATKINE et al., 1982). Ces observations sont en contradiction avec ce que nous constatons chez la truite lors du traitement d'ovocytes dénudés par la  $17\alpha 20\beta$ DHP, puisque la maturation se déclenche dans des ovocytes dont les niveaux d'AMPc sont supérieurs aux niveaux de base.

On pourrait objecter que la mesure globale du contenu ovocytaire en AMPc n'est pas à même de révéler des variations survenant au niveau d'un compartiment cellulaire précis. La valeur seuil déclenchant la reprise de la méiose ne serait franchie que dans cet unique compartiment et pourrait ne pas être mise en évidence.

L'autre éventualité serait que la  $17\alpha,20\beta$ DHP agisse effectivement sur les niveaux d'AMPc ovocytaires mais provoque la reprise de la méiose par des mécanismes ne mettant pas directement en jeu ce nucléotide.

Nos résultats confortent cette deuxième hypothèse :

- La testostérone, l'insuline, ou de très faibles concentrations de  $17\alpha,20\beta$ DHP qui n'induisent pas la reprise de la méiose, provoquent une diminution des niveaux d'AMPc identique à celle induite par des concentrations maturantes de  $17\alpha,20\beta$ DHP.

- Il n'existe, d'autre part, aucune relation entre l'ampleur de la chute d'AMPc et le pourcentage d'ovocytes qui reprennent leur méiose.

On comprend mal, dans l'hypothèse où les mécanismes déclenchant la maturation seraient identiques à ceux décrits chez le xénope, comment 2 chutes comparables des niveaux d'AMPc pourraient suivant les cas induire ou non la maturation des ovocytes.

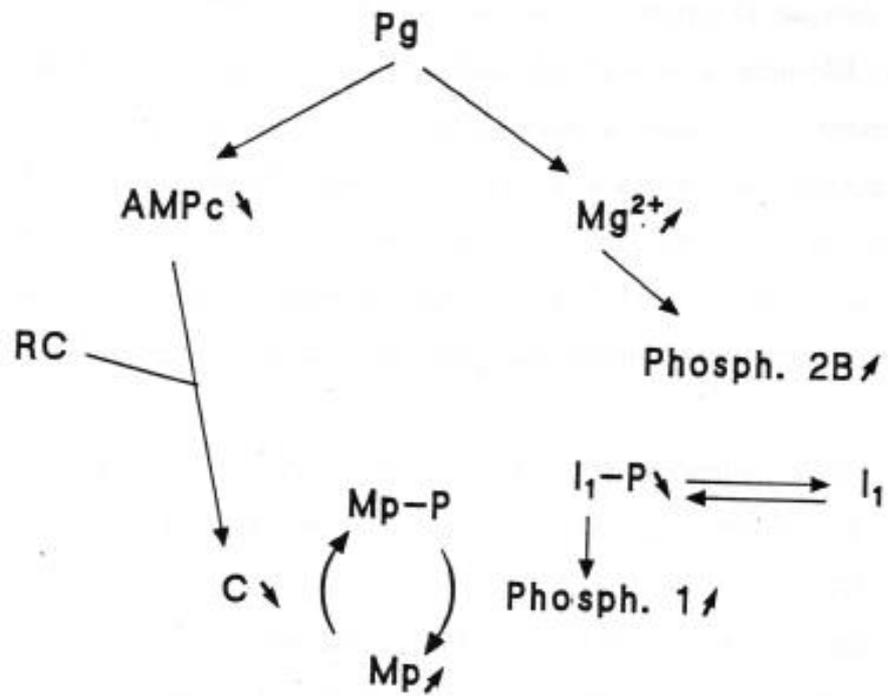
Dans ces conditions, il semble plus probable que la chute des niveaux d'AMPc ne provoque pas la reprise de la méiose des ovocytes de truite arc-en-ciel, ou tout au moins qu'elle ne soit pas une condition suffisante au déclenchement de la maturation.

Cette conclusion est en accord avec les résultats obtenus chez l'étoile de mer. Chez cet invertébré, l'hormone maturante (la 1-méthyladénine) provoque la diminution des niveaux d'AMPc ovocytaires (MEIJER et ZARUTSKIE, 1987). Pourtant, ni la microinjection de phosphodiesterase (MEIJER et ZARUTSKI, 1987), ni celle d'inhibiteurs des protéines kinases AMPc dépendantes (MEIJER et al., 1989) n'induisent la reprise de la méiose des ovocytes ainsi traités. Il en a été conclu qu'il existerait une double voie de contrôle, l'une levant l'inhibition exercée par l'AMPc, l'autre stimulant l'apparition du MPF et provoquant la GVBD. Chez le xénope au contraire, il a été admis que la diminution de l'AMPc ovocytairre était une condition

suffisante pour provoquer la GVBD : la diminution d'activité de la protéine kinase AMPc dépendante provoquée par la microinjection de l'inhibiteur de cette protéine kinase ou par la microinjection de sa sous unité R, suffit à provoquer la reprise de la méiose (MALLER et KREBS, 1977 ; HUCHON et al., 1981a). Récemment pourtant GELERSTEIN et collaborateurs (1988) ont montré que l'adénosine provoquait la maturation des ovocytes tout en augmentant les niveaux d'AMPc ovocytaires alors que, à l'inverse, l'acétylcholine diminuait ces niveaux de 10 à 40 pour-cent sans provoquer la maturation des ovocytes. Tout comme chez l'étoile de mer et chez la truite, ces auteurs suggèrent qu'il existerait une 2ème voie de contrôle de la maturation, parallèle à celle mettant en jeu l'AMPc.

Quels pourraient être, chez ces différentes espèces, les mécanismes incriminés lors de l'induction de la maturation, indépendamment de la voie mettant en jeu l'AMPc ?

De nombreux travaux ont analysé le rôle des cations divalents lors de la reprise de la méiose des ovocytes d'amphibiens. Il a été montré que l'absence de  $Ca^{2+}$  et de  $Mg^{2+}$  ou la présence d'EDTA dans le milieu d'incubation inhibait la reprise de la méiose (MERRIAM, 1971 ; MAROT et al., 1976 ; MASUI et al., 1977). D'autre part de nombreux traitements augmentant la concentration intraovocytaire en  $Ca^{2+}$  ou en  $Mg^{2+}$  (ionophorèse, ionophore, fortes concentrations en divalent dans le milieu de culture) induisent la reprise de la méiose (MOREAU et al., 1976 ; WASSERMAN et MASUI, 1975 ; BALTUS et al., 1977). Il semble néanmoins, après de longues controverses, que la progestérone ne provoque pas d'augmentation du calcium intraovocytaire et ne soit donc pas impliquée en tant que second messenger lors de la maturation des ovocytes de xénope (voir pour revue CORK et al., 1987 ; CICIRELLI et SMITH, 1987).



*Schéma 2.* Modèle de mécanisme d'action de la progestérone sur la reprise de la méiose ovocytaire. Pg : progestérone ; Phosph. 2B : protéine phosphatase 2B ; I<sub>1</sub>-P/I<sub>1</sub> : inhibiteur 1 de la phosphatase 1 ; Phosph. 1 : protéine phosphatase 1 ; C : sous unité catalytique de la protéine kinase AMPc dépendante ; Mp-P et Mp : protéine de maturation phosphorylée ou non.

Récemment pourtant BELLE et collaborateurs (1986) ont montré chez le Xénope que la micro injection de  $Mg^{2+}$  provoquait la GVBD en absence de progestérone, sans modifier les niveaux d'AMPC ovocytaires. L'induction de la maturation par  $Mg^{2+}$  étant inhibée par la toxine cholérique, l'hypothèse avancée est que ce divalent activerait, directement ou non, les protéines phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de la protéine de maturation (MP), cette déphosphorylation conduisant à l'apparition du MPF. La progestérone provoquerait la maturation en agissant, d'une part sur les protéines kinases via l'AMPc, et d'autre part sur les phosphatases par l'intermédiaire d'une augmentation de la concentration ovocytaire en  $Mg^{2+}$  (schéma 2). La mise au point de microélectrodes spécifiques devrait permettre de tester cette hypothèse tant chez les amphibiens que chez les poissons.

Les divalents ne sont pas les seuls candidats susceptibles d'agir comme deuxième messager. Chez le Xénope l'insuline provoque in vitro la maturation des ovocytes via les récepteurs aux IGF1 (MALLER et KOONTZ, 1981). Elle agit à la fois en inhibant l'adénylate cyclase et en stimulant certaines phosphodiesterases (SADLER et MALLER, 1987). Pourtant, contrairement à la progestérone, certains de ses effets sur l'ovocyte (augmentation du  $pH_i$ , phosphorylation de la protéine ribosomale S6) ne sont pas bloqués par la toxine cholérique (STITH et MALLER, 1984) et pourraient mettre en jeu des mécanismes indépendants de l'AMPC. Comme pour d'autres types cellulaires, l'insuline modifierait le turn-over de phosphoinositides membranaires, et, augmentant la production de diacylglycérol (DAG), activerait la protéine kinase C.

A l'appui de cette hypothèse il a été montré chez les amphibiens (STITH et MALLER, 1987 ; KLEIS-SAN FRANCISCO et SCHUETZ, 1988 ; LAURENT et al., 1988) comme chez les mammifères (ABERDAM et DECKEL, 1985 ; LEFEVRE et al., 1988), que l'activation de la protéine kinase C par les esters de phorbol induisait la

reprise de la méiose. De plus, chez le xénope, l'inhibition de la production du DAG bloquerait la maturation lorsqu'elle est induite par l'insuline, et non pas lorsqu'elle est induite par la progestérone (STITH et MALLER, 1987). Il existerait donc chez le xénope, une protéine kinase C activable par l'insuline, et non par la progestérone, dont la stimulation pourrait provoquer la maturation des ovocytes. Là encore, une double voie de contrôle de la GVBD a été mise en évidence, l'une passant par l'AMPC, l'autre par les phospholipides membranaires.

Bien que chez le xénope ces 2 possibilités d'induction de la reprise de la méiose ne soient pas mises en jeu par les mêmes hormones, il est envisageable qu'il n'en soit pas de même chez la truite arc-en-ciel.

D'autre part, ces 2 voies de contrôle ne sont pas totalement indépendantes l'une de l'autre puisque la maturation des ovocytes reste impossible en présence de toxine cholérique. Quel que soit le mécanisme d'action de l'hormone maturante, l'AMPC conserve ses potentialités inhibitrices.

Enfin d'autres phospholipides membranaires pourraient jouer un rôle dans l'induction de la maturation par la progestérone. CHIEN et collaborateurs (1986) ont montré en effet que la progestérone produisait chez *Rana* une augmentation de la méthylation de la phosphatidyléthanolamine. L'injection du produit de cette méthylation serait capable de provoquer la maturation des ovocytes en absence de progestérone, vraisemblablement en modifiant la fluidité membranaire, comme le suggèrent les expériences de MORRILL et collaborateurs (1989).

Malgré les différences que nous avons pu mettre en évidence chez la truite et chez le xénope dans l'implication de l'AMPC ovocytaire au cours de la maturation, il semble que certaines convergences puissent être dégagées :

- Chez la truite comme chez le Xénope, les hormones qui provoquent la reprise de la méiose font chuter les niveaux d'AMPc ovocytaires (que cette chute soit ou non à l'origine de la maturation).

- Chez ces 2 espèces l'insuline, qu'elle induise ou non la reprise de la méiose, est susceptible d'agir sur le niveau de l'AMPc ovocyttaire.

- Il semble vraisemblable aujourd'hui que la progestérone chez le Xénope comme la  $17\alpha,20\beta$ DHP chez la truite induisent la reprise de la méiose par différents types de mécanismes dont certains ne mettraient pas directement en jeu une chute des niveaux d'AMPc ovocytaires.

## DISCUSSION GENERALE CONCLUSIONS ET CONJECTURES

Les études que nous avons menées tant sur ovocytes intrafolliculaires que sur ovocytes dénudés ont permis de mettre en évidence que les niveaux d'AMPc ovocytaires chez la truite arc-en-ciel, sont contrôlés par un ou plusieurs facteurs d'origine folliculaire durant toute la fin du cycle ovarien.

La possibilité que ce contrôle soit exercé par des facteurs de type insuline nous semble apporter un éclairage nouveau sur le rôle biologique de ces substances lors de la reprise de la méiose. Malgré ce qui est observé chez le xénope, où l'insuline est capable de provoquer la reprise de la méiose ovocytaire, il semble vraisemblable à la lumière de nos résultats que l'insuline et les facteurs de croissance agissent sur l'ovocyte avant la reprise de la méiose, pour réguler les niveaux d'AMPc intraovocytaires et non en tant que facteur inducteur de la maturation.

Nous avons pu démontrer que la reprise de la méiose induite par la 17 $\alpha$ 20BDHP (ou tout au moins la GVBD puisque seul ce critère a été pris en compte comme indice de la reprise de la méiose) n'est pas la conséquence (dans nos conditions expérimentales) d'une chute globale des niveaux d'AMPc ovocytaires.

Le modèle que nous proposons, bien que s'appuyant sur certaines hypothèses non encore vérifiées chez la truite arc-en-ciel, permettrait d'expliquer nombre de questions qui ont été soulevées lors de cette étude :

L'ovocyte de truite arc-en-ciel, contrairement à ce qui a été décrit chez les amphibiens, ne posséderait pas son propre système de contrôle de ses niveaux d'AMPc.

Chez le xénope il a été montré que très tôt au cours de l'ovogenèse se mettaient en place des mécanismes de rétrocontrôle de la concentration en AMPc des ovocytes. Il existerait dans l'ovocyte une protéine, substrat des protéines kinases AMPc dépendantes, dont la forme phosphorylée inhiberait la production d'AMPc (MULNER et al., 1983 ; schéma 3).

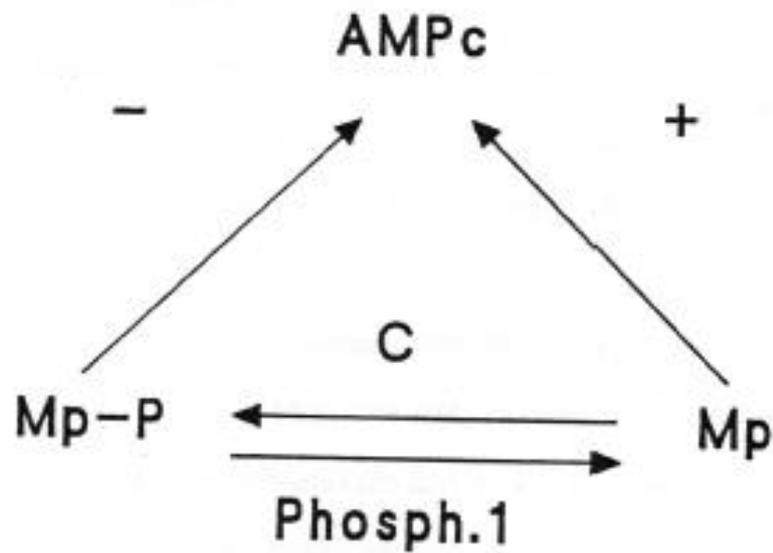


Schéma 3. Modèle possible de la régulation du niveau de l'AMPc ovocytaire par un mécanisme de rétrocontrôle. C : sous unité catalytique de la protéine kinase AMPc dépendante ; Mp-P et Mp : protéine de maturation phosphorylée ou non ; Phosph. 1 : protéine phosphatase 1.

L'inhibition de la phosphorylation de cette protéine provoque effectivement une augmentation importante de la concentration ovocytaire du nucléotide.

Chez la truite on peut émettre l'hypothèse de l'absence de tels mécanismes d'auto-contrôle. La régulation des niveaux d'AMPc ovocytaires serait assurée par l'intermédiaire de substances produites par les cellules de la granulosa. L'accumulation d'AMPc dans l'ovocyte consécutivement à une dénudation, serait la conséquence de la levée de l'inhibition exercée par le follicule.

Nous avons évoqué précédemment le paradoxe qui semblait exister entre l'hypothèse d'une maturation ovocytaire déclenchée par la chute des niveaux d'AMPc, et l'augmentation parallèle de la sensibilité à l'hormone maturante et de la concentration en AMPc des ovocytes.

Nous avons démontré qu'il n'existait pas de relation entre le pourcentage d'ovocytes maturants et les niveaux d'AMPc dans ces ovocytes après action de la  $17\alpha 20\beta$ DHP (figure 19).

Nous avons mis en évidence également qu'il était possible d'obtenir 100% de maturation ovocytaire avec des niveaux d'AMPc supérieurs aux niveaux de base.

En d'autres termes la réponse des ovocytes à l'hormone maturante ne dépend pas (dans une certaine mesure) des niveaux d'AMPc, ni avant ni après l'apport du stéroïde. Ceci expliquerait que les concentrations en nucléotide puissent augmenter en fin de croissance ovocytaire sans interférer avec l'évolution de la sensibilité.

Cette augmentation des concentrations ovocytaires en AMPc constatée en fin de cycle ovarien, pourrait être due à un accroissement dans l'ovocyte des capacités de synthèse en nucléotide. Dans cette hypothèse, la levée de l'inhibition folliculaire lors de la dénudation devrait permettre aux ovocytes proches de l'ovulation (VG+) de produire plus d'AMPc que ceux qui en sont éloignés (FV). Il ne semble pas que ce soit le cas, puisque les niveaux maxima atteints après dénudation sont identiques chez les ovocytes aux stades FV et VG+.

L'augmentation d'AMPc en fin d'ovogenèse serait plutôt la conséquence de la diminution de l'inhibition exercée par le follicule, du fait, soit d'une synthèse plus faible des substances inhibitrices, soit d'une perte de l'efficacité de ces substances sur l'ovocyte.

Si une faible augmentation de l'AMPc ovocytaire n'est pas préjudiciable au déclenchement de la maturation, une augmentation plus importante des niveaux de ce nucléotide est capable, chez la truite comme chez le xénope, d'inhiber totalement l'induction de la reprise de la méiose. Le contrôle exercé sur l'ovocyte par le follicule doit donc permettre de maintenir des niveaux d'AMPc compatibles avec la maturation. Le pic préovulatoire de  $17\alpha20\beta$ DHP, en bloquant toute augmentation d'AMPc dans l'ovocyte, prendrait en quelque sorte le relais des facteurs folliculaires avant que ne survienne l'ovulation. L'action de la  $17\alpha20\beta$ DHP sur l'AMPc ovocytaire, nous apparaît plus comme le blocage des potentialités inhibitrices d'une élévation des niveaux du nucléotide, que comme un facteur déclenchant, par lui-même, la reprise de la méiose. En cela, la maturation ovocytaire chez la truite se rapprocherait plus du modèle proposé chez l'étoile de mer (MEIJER et al., 1989) que de celui en vigueur chez le xénope. Chez la truite arc-en-ciel la  $17\alpha20\beta$ DHP agirait sur l'ovocyte à travers une double voie de contrôle :

A) Tout d'abord en maintenant de manière durable les niveaux d'AMPc à un niveau compatible avec la reprise de la méiose et avec l'évolution ultérieure de l'ovocyte :

- DEMANNO et GOETZ (1987) chez le saumon de fontaine et SCHORERET-SLATKINE et BAULIEU (1982) chez le xénope montrent que les fortes concentrations d'AMPc produites sous l'effet de la forskoline restent inhibitrices pendant plus du tiers de la durée de la maturation.

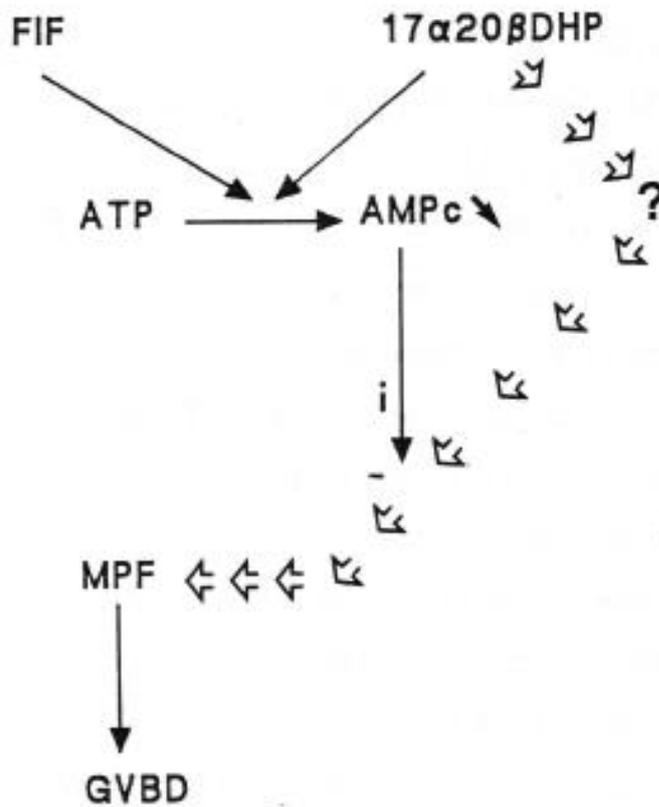


Schéma 4. Modèle de mécanisme d'action de la 17α20βDHP sur la reprise de la méiose ovocytaire. FIF : facteur inhibiteur folliculaire ; MPF : facteur inducteur de la maturation (GVBD) ;  $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$  : mécanismes inducteurs de la maturation ; i : mécanismes inhibiteurs de la maturation.

- Il a été montré par ailleurs que l'AMPc inhibait également les divisions mitotiques d'un certain nombre de lignées cellulaires (NOSE et KATSUTA, 1975 ; STAMBROOK et VELEZ, 1976), ce qui laisse supposer que de trop fortes concentrations en nucléotide dans l'ovocyte pourraient nuire à l'initiation du futur développement embryonnaire.

- Nous avons montré que les concentrations maturantes de  $17\alpha 20\beta$ DHP agissaient sur l'AMPc ovocytaire de manière prolongée, voire irréversible puisque les niveaux du nucléotide n'augmentent pas après l'ovulation. Si l'on assimile la dénudation à une ovulation artificielle, c'est donc vraisemblablement grâce à cette action durable de la  $17\alpha 20\beta$ DHP que les niveaux d'AMPc se maintiennent à un niveau rendant possible l'évolution de l'ovocyte.

B) Indépendamment de la voie mettant en jeu une diminution (ou un contrôle) des niveaux d'AMPc, la  $17\alpha 20\beta$ DHP induirait l'apparition du MPF et la reprise de la méiose au travers de mécanismes qui restent encore à déterminer. C'est cette voie de contrôle de la maturation qui pourrait être inhibée par les fortes concentrations d'AMPc.

A l'issue de ce travail il nous est possible de proposer le schéma suivant (représentation ci-contre) :

1°. Avant maturation : les cellules de la granulosa contrôlent les niveaux d'AMPc dans l'ovocyte par l'intermédiaire de facteurs inhibiteurs (de type IGF1 par exemple). Au fur et à mesure de la croissance ovocytaire ce contrôle tend à diminuer, ce qui entraîne une légère augmentation des niveaux d'AMPc dans l'ovocyte.

On peut s'interroger sur le rôle biologique d'une telle augmentation. Comme le suggèrent LESSMAN et collaborateurs (1988), il est possible que l'AMPc, en agissant sur la polymérisation de la tubuline ovocytaire, favorise la migration de la vésicule germinative vers la périphérie de l'ovocyte.

Indépendamment de l'augmentation des niveaux d'AMPc on assiste à l'accroissement de la sensibilité des ovocytes à la  $17\alpha 20\beta$ DHP. Ceci s'explique vraisemblablement par la mise en place progressive des mécanismes qui entreront en jeu lors de l'induction de la maturation.

2) Durant le déclenchement de la maturation : la  $17\alpha 20\beta$ DHP prend le relais des facteurs folliculaires et maintient l'AMPc ovocytaire à son niveau de base ou provoque une très légère diminution de sa concentration dans l'ovocyte. Le stéroïde induit la reprise de la méiose par des mécanismes ne mettant pas directement en jeu une chute d'AMPc mais pouvant être inhibés par de fortes concentrations en nucléotide.

La reprise de la méiose dépendrait en fait de l'équilibre entre des mécanismes inhibiteurs impliquant l'AMPc, et des mécanismes inducteurs résultant de l'action du stéroïde maturant sur l'ovocyte. Ceci n'exclue pas que, comme chez les amphibiens, la déphosphorylation d'une protéine dite de maturation (MP) soit à l'origine de la cascade d'événements conduisant à l'apparition du MPF et à la reprise de la méiose. Dans cette hypothèse, les mécanismes inducteurs de la reprise de la méiose pourraient par exemple mettre en jeu l'activation d'une phosphatase (voir schéma 2) comme cela a été suggéré chez le xénope (BELLE et al., 1986). La prépondérance des mécanismes inhibiteurs ou stimulateurs pourrait expliquer les différences constatées entre certaines espèces lors de l'induction de la reprise de la méiose :

- Chez l'étoile de mer, la chute des niveaux d'AMPc en dessous de leur niveau de base, ou l'inhibition de la protéine kinase AMPc dépendante, ne déclenchent pas la maturation des ovocytes. L'induction de la reprise de la méiose ne pourrait pas être obtenue uniquement par la levée de l'inhibition exercée par l'AMPc, mais nécessiterait aussi la mise en jeu de mécanismes stimulateurs.

- Chez le xénope au contraire, la maturation ovocytaire pourrait être obtenue soit par la levée de l'inhibition exercée par l'AMPc, soit par l'intermédiaire des mécanismes stimulateurs.

- Chez la truite arc-en-ciel il est possible de déclencher la maturation même lorsque les concentrations d'AMPc sont supérieures aux niveaux de base. Les mécanismes stimulateurs pourraient contrebalancer jusqu'à un certain point les mécanismes inhibiteurs.

Contrairement à ce qui a été montré chez l'étoile de mer, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer qu'une chute de l'AMPc ovocytaire en dessous des niveaux de base ne suffise pas à provoquer (artificiellement ?) la reprise de la méiose.

A la lumière de nos résultats, il semble néanmoins plus probable que la  $17\alpha,20\beta$ DHP se substituant aux facteurs folliculaires empêche l'élévation de l'AMPc ovocytaire, mais provoque la reprise de la méiose par des mécanismes ne mettant pas directement en jeu une chute de l'AMPc dans l'ovocyte.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aberdam, E., and Deckel, N. (1985). Activator of protein kinase C stimulate meiotic maturation of rat oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132,570-574.
- Baltus, E., Hanocq-Quertier, J., Pays, A., and Brachet, A. (1977). Ionics requirements for induction of maturation (meiosis) in full-grown and medium sized *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74,3461-3465.
- Baulieu, E.E., Schorderet-Slatkine, S., Le Goascogne, C., and Blondeau, J.-P. (1985). A membrane receptor mechanism for steroid hormones reinitiating meiosis in *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Growth Differ.* 27, 223-231.
- Belle, R., Mulner-Lorillon, O. Marot, J., and Ozon, R. (1986). A possible role for Mg<sup>2+</sup> ions in the induction of meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. *Cell. Differ.* 19, 253-251.
- Birchmeier, C., Broek, D. and Wigler, M. (1985). RAS proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 43,615-621.
- Brachet, J., Baltus, E, De Schutter A., Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., Hubert, E., Iacobelli, S. and Steinert, G. (1974). Biochemical changes during progesterone induced maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 3, 189-205.
- Bravo, R., Otero, C. Allende, C. and Allende J.E. (1978). Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1242–1246.

- Cartaud, A., Marcher, K. and Ozon, R. (1984). Digitoxigenin, a digitalis steroid, induces meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Steroid Biochem.* 21, 101106.
- Chien, E.J., Kostellow, A.B. and Morrill, G.A. (1986). Progesterone induction of phospholipid methylation and arachidonic acid turnover during the first meiotic division in amphibian oocytes. *Life Sci.* 39, 1501-1508.
- Cicirelli, M.F. and Smith, L.D. (1985). Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus oocytes*. *Develop. Biol.* 108, 254-258.
- Cicirelli, M.F. and Smith, L.D. (1987). Do calcium and calmodulin trigger maturation in amphibian oocytes ? *Develop. Biol.* 121, 48-57.
- Cork, R.J., Cicirelli, M.F. and Robinson, K.R. (1987). A rise in cytosolic calcium is not necessary for maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.* 121, 41-47.
- Deckel, N. (1987). Interaction between the oocyte and the granulosa cells in the preovulatory follicle. In : *Endocrinology and physiology of reproduction*. New York: lenum Press, pp. 197-209.
- Demanno, D.A. and Goetz, F.W. (1987a). Steroid induced final maturation in brook trout *Salvelinus fontinalis* oocytes in vitro : the effects of forskolin and phosphodiesterase inhibitors. *Biol. Reprod.* 36,1321-1332.
- Demanno, D.A. and Goetz, F.W. (1987b). The effect of forskoline, cAMP and anoketone on steroid induced meiotic maturation of yellow perch (*Perca avescens*) oocytes in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 66, 233-243.

- Demanno, D.A. (1987). The role of cyclic-AMP in steroid-induced final maturation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. PH.D. University of Notre Dame.
- Deshpande, A.K. and Koide, S.S. (1985). In vitro induction of *Xenopus* oocyte maturation by 4-pregnene-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol-3-one. Gen. Comp. Endocrinol. 57, 130-134.
- Deshpande, A.K. and Kung H-F. (1987). Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins. Mol. cell. Biol. 7, 1285-1288.
- Dettlaff, T.A. and Skoblina M.N. (1969). The role of germinal vesicle in the process of oocyte maturation in Anura and Acipenseridae. Ann. Emb. Suppl. 1, 133-151.
- Drury, K.C. and Schorderet-Skatkine, S. (1975). Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. Cell 4, 426-274.
- Dumont, J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis*. I. Stage of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphol. 136, 153-180.
- El-Etr, M. Schorderet-Slatkine, S. and Baulieu E.E. (1979). Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin. Science 205,1397-1399.
- Finet, B. Jalabert, B., and Garg, S.K. (1988). Effect of defolliculation and 17 $\alpha$ hydroxy,20 $\beta$ -dihydroprogesterone on cyclic AMP level in full-grown oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gamete Res. 19, 241-252.

- Finidori, J., Hanoune, J., and Baulieu, E-E. (1982). Adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes : characterization of the progesterone-sensitive membrane-bound form. Cell. Endocrinol. 28, 211-227.
- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J. and Baulieu, E. E. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. Nature 292, 255-257.
- Fostier, A., Jalabert, B. and Terqui, M. (1973). Action prédominante d'un dérivé hydroxylé de la progestérone sur la maturation *in vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. C. R. Acad. Sci. 292, 777-780.
- Fostier, A., Jalabert, B., Campbell, C. Terqui, M. and Breton, B. (1981a). Cinétique de libération *in vitro* de la 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone par des follicules de truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. C.R. Acad.Sci. 292, 777-780.
- Fostier, A., Breton, B., Jalabert, B. and Marcuzzi, O. (1981b). Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 $\alpha$ -hydroxy,20 $\beta$ dihydroprogestérone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*. C. R. Acad. Sci. 293,817-820.
- Gawler, D.etal (1987). Nature 327, 229-232.
- Gelerstein, S., Shapira, H., Dascal, N., Yekuel, R. and Oron, Y. (1988). Is a decrease in clic AMP a necessary and sufficient signal for maturation of amphibian oocytes ? Develop. Biol. 127, 25-32.
- Gilman, A.G. 1970. A protein binding assay for adenosine 3:5'-cyclic monophosphate. Proc. Nat. Sci. 67,305-312.

- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. and Baulieu, E.-E. (1978).  
Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,2352-2357.
- Goetz, F.W. (1983). Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In: "Fish Physiology, Vol D<sub>x</sub>: Reproduction, Part B " (W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson, ed.), pp. 117-170. Academic Press, New York.
- Goetz, F.W. and Hennessy, T. (1984). The in vitro effects of phosphodiesterase inhibitors on 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one-induced germinal vesicle breakdown in brook trout *Salvelinus fontinalis* oocytes. Comp. Biochem. Physiol. 77A,785-786.
- Goswami, S.V. and Sundararaj, B.I. (1973). Effect of actinomycin D, mitomycin C, puromycin and cycloheximide on desoxycorticosterone-induced in vitro maturation in oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). J. Exp. Zool. 185,327-332.
- Hammond, J.M., Baranao, J.L.S., Skaleris, D, Knight, A.B., Romanu, J.A., and Rechler, M.IN. (1985). Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. Endocrinology 117, 2553-2555.
- Hanoune, J., Stengel, D., Lacombe, M.L. (1982). Proteolytic activation and solubilization of adenylate and guanylate cyclases. Moll. Cell. Endocrinol. 31, 21-41.
- Hildebrandt, J.D., Sekura, R.D., Codina, J., Iyengar, R., Manclark, C.R., and Birnbaumer, L. (1983). Stimulation and inhibition of adenylate cyclases mediated by distinct regulatory proteins. Nature 302, 706-709.

- Huchon, D., Ozon, R., Fischer, E.H. and Demaille, J.G. (1981). The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis* meiotic maturation. Mol. Cell. Endocrinol. 22, 211-222.
- Huchon, D., and Ozon, R. (1979). Effect of 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and cholera toxin on maturation induced by the injection of maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. Biol. Cellulaire 35, 15-20.
- Ishikawa, K., Hanaoka, Y., Kondo, Y. and Imai, K. (1977). Primary action of steroid hormone at the surface of amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown. Mol. Cell. Endocrinol. 9, 91-100.
- Iwamatsu, T., Takahashi, S.Y., Sakai, N., Nagahama, Y. and Onitake, K. (1987). Induction and inhibition of in vitro oocyte maturation and production of steroids in fish follicles by forskolin. J. Exp. Zool. 241, 101-111.
- Jalabert, B. (1976). In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo airdneri*), northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auratus*). J. Fish. es. Board Can. 33, 974-988.
- Jalabert B. and Finet, B. (1986). Regulation of oocyte maturation in rainbow trout, *Salmogairdneri*: role of cyclic AMP in the mechanism of action of the maturation inducing steroid (MIS), 17 $\alpha$ -hydroxy,20 $\beta$ -dihydroprogesterone. Fish. Physiol. Biochem. 2, 65-74.
- Jalabert B. and Fostier, A. (1984). The follicular sensitivity in vitro to maturation inducing hormones in rainbow trout, *Salmo gairdneri* : role of oestradiol-17 $\beta$ . Aquaculture 43, 1-11.

- Jordana, X., Otero, C., Allende, C.C., Allende, J., Flawia, M., Kornblihtt, A.R. and Torres, H.N. (1981). Adenylate cyclase activity in *Xenopus laevis* ovarian follicles. *Mol. Cell. Biochem.* 40, 85-91.
- Jordana, X, Olate, J., Allende, C.C., and Allende, J.E. (1984). Studies on the mechanism of inhibition of amphibian oocyte adenylate cyclase by progesterone. *Arc. Biochem. Biophysics.* 228,379-387.
- Katada, T., and Ui, M. (1982). Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79, 3129-3133.
- Kleis-San Francisco, S., and Schuetz, A. (1988). Role of protein kinase c activation in oocyte maturation and steroidogenesis in ovarian follicle of *Rana pipiens*: studies with phorbol 12-myristate 13-acetate. *Gamete Res.* 21,323-334.
- Korn, L.J., Siebel, C.W., McCormick, F. and Roth, R.A. (1987). Ras p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes. *Science* 236,840-843.
- Krebs, E.G. (1972). Protein kinases. *Curr. Top. Cell Regul.* 5,99-134.
- Krebs, E.G., and Beavo, J.A. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48,923-959
- Laurent, A., Basset, M., Dorée, M., Le Peuch, C.J. (1988). Involvement of a calcium phospholipid-dependent protein kinase in the maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Letters* 226,324-330.

- Lefèvre, B., Gougeon, A., Peronny, H., and Testar, J. (1988). A gonadotropin-releasing hormone agonist and an activator of protein kinase C improve in vitro oocyte maturation in *Macaca fascicularis*. *Gamete Res.* 21, 193-197.
- Lessman, C.A. (1985). Effect of insulin on meiosis reinitiation induced in vitro by three progestogens in oocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). *Develop. Biol.* 107, 259-263.
- Lessman, C.A. and Schuetz, A.W. (1981). Role of follicle wall in meiosis reinitiation induced by insulin in *Rana pipiens* oocytes. *Amer. J. Physiol.* 241, E51-E56.
- Lessman, C.A. Habibi, H.R., and Macrae, T.H. (1988). Effect of microtubule reactive drugs on steroid- and centrifugation-induced germinal vesicle migration during goldfish. oocyte meiosis. *Biol. Cell* 64, 293–299.
- Magnusson, C., and Hillensjö, T. (1977). Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP. *J. Exp. Zool.* 201, 139-147.
- Maller, J.L. Butcher, F.R. and Krebs, E.G. (1979). Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 579,-582.
- Maller, J.L. and Koontz, J.W. (1981). A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. *Develop. Biol.* 85,309-316.
- Maller, J.L. and Krebs, E.G. (1977). Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 252, 1712-1718.

- Maller, J.L. and Krebs, E.G. (1980). Regulation of oocyte maturation. *Curr. Top. Cell Regul.* 16, 271-311.
- Marot, J., Belle, R., and Ozon, R. (1976). Recherches sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Arguments en faveur du rôle des ions calcium. *C.R. Acad. Sci. Paris* 282, 1301-1304.
- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 117, 129-146.
- Masui, Y, Meyerhof, P.G., Miller, M.A., and Wasserman, WJ. (1977). Role of divalent cations in maturation and activation of vertebrate ovocytes. *Differentiation* 9, 4957.
- Masui, Y. and Clarke, H.J. (1979). Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* 57, 185-282.
- Masui, Y. and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 117, 129-146.
- Meijer, L., Jastorff, B., Dostmann, W., Genieser, H.G., and Butt, E. (1989). Starfish oocyte maturation : evidence for a cyclic AMP-dependent inhibitory pathway. *Dev. Biol.* 133, 58-66.
- Meijer, L., and Zarutskie, P. (1987). Starfish oocyte maturation : 1-methyladenine triggers a drop of cAMP concentration related to the hormone-dependent period. *Dev. Biol.* 121,306-315.

- Merriam, R.W. (1971). Progesterone-induced maturational events in oocytes in *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp. Cell Res.* 68,81-87.
- Meurs, H., Kauffmann, H.F., Koeter, G., Devries, K. (1980). Extraction of cyclic AMP for the determination in the competitive protein binding assay. *Clin. Chim. Acta.* 106,91-97.
- Moor, R.M., and Heslop, J.P. (1981). Cyclic AMP in mammalian follicle cells and oocytes during maturation. *J. Exp. Zool.* 216, 205-209.
- Moreau, M., Doree, M. Guerrier, P. (1976). Electrophoretic introduction of calcium ions into the cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation. *J. Exp. Zool.* 197, 443-449.
- Morrill, G.A., Schatz, F., Kostellow, A.B. and Poupko, J.M. (1977). Changes in Cyclic AMP levels in the amphibian ovarian follicle following progesterone induction of meiotic maturation. *Differentiation.* 8,97-104.
- Morrill, G.A., Doi, K., and Kostellow, A.B. (1989). Progesterone induces transient changes in plasma membrane fluidity of amphibian oocytes during the first meiotic division. *Arch. Biochem. Biophys.* 269,690-694.
- Mulner, O (1983). Role de l'AMP cyclique dans le contrôle de la maturation méiotique de l'ovocyte de *Xenopus*. *Thèse de doctorat d'état. Université de Paris 6.*
- Mulner, O., Huchon, D., Thibier, C. and Ozon, R. (1979). Cyclic AMP synthesis in *Xenopus laevis* oocytes. Inhibition by progesterone. *Bioch. Biophys. Acta* 582, 179-184.

- Mulner, O., Belé, R., and Ozon, R. (1983). cAMP-dependent protein kinase regulates in ovo cAMP level of the *Xenopus* oocyte: evidence for an intracellular feedback mechanism. *Moll. Cell. Endocrinol.* 31, 151-160.
- Mulner, O., Cartaud, A., Ozon, R., (1980). Cyclic AMP phosphodiesterase activities in *Xenopus laevis* oocytes. *Differentiation* 16, 31-39.
- Mulner, O., Megret, F., Alouf, J.E., and Ozon, R. (1985). Pertussis toxin facilitates the progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *FEBS Letters* 181,397-402.
- Mulner, O. and Ozon, R. (1981). The roles of follicular envelopes in the initiation of *Xenopus* oocytes maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 335-343.
- Nagahama, Y. (1987). 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one. A teleost maturation inducing hormone. *Develop. Growth Differ.* 29, 1-12.
- Nagahama, Y. Kagawa, H., Adachi, S., and Young G. (1985). Stimulation of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the granulosa cells of amago salmon, *Onchorhynchus rhodurus*, by cyclic nucleotides. *J. Exp. Zool.* 236, 371-375.
- Nose, K., and Katsuta, H. (1975). Arrest of cultured rat liver cells in G2 phase by the treatment with dibutyryl cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64,983-988.
- O'Connor, C.M. and Smith, L.D. (1976). Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev. Biol.* 52, 318-322.

- Olate, J., Allende, J.E., Sekura, R.D., and Birnbaumer, L. (1984). Oocyte adenylate cyclase contains Ni, yet the guanine nucleotide-dependent inhibition by progesterone is not sensitive to pertussis toxin. *FEBS letters* 175, 25-30.
- Ozon, R., Bellé, R. Huchon, D. and Marot, J. (1978). cAMP-dependent protein kinases and the control of progesterone-induced maturation in amphibian oocytes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 483-491.
- Pays-De Schutter, A., Kram, R., Hubert, E. and Brachet, J. (1975). Cyclic nucleotides and amphibian development. *Exp. Cell Res.* 96, 7-14.
- Rodbell, M. (1980). The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17-22.
- Sadler, S.E., Maller, J.L., and Cooper, D.M.F. (1984). Progesterone inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase is not mediated via the Bordetella pertussis toxin substrate. *Mol. Pharmacol.* 26, 526-531.
- Sadler, S.E., Maller, J.L. (1983). Inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase by progesterone and 2'5'-dideoxyadenosine is associated with slowing of guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 258,7935-7941.
- Sadler, S.E. and Maller, J.L. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 256, 6368-6376.
- Sadler, S.E. and Maller, J.L. (1982). Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257,355-361.

- Sadler, S.E. and Maller, J.L. (1987). In vivo regulation of Cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin like growth factor. *J. Biol. Chem.* 262, 10644-10650.
- Schorderet-Slatkine, S. (1972). Action of progesterone and related steroids on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *In vitro study. Cell Differ.* 1, 179-189.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M., Boquet, P. Godeau, F. and Baulieu, E.E. (1978). Progesterone induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes : a role for cAMP at the "maturation-promoting factor" level. *Cell* 15, 1269-1275.
- Schorderet-Slatkine.S., Schorderet, M. and Baulieu, E.E. (1982). Cyclic AMP-mediated control of meiosis: effects of progesterone, cholera toxin and membrane active drugs in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79,850-854.
- Schorderet-Slatkine, S., and Baulieu, E-E. (1982). Forskolin increases cAMP and inhibits progesterone induced meiosis reinitiation in *Xenopus laevis* oocytes. *Endocrinol.* 111, 1385-1387.
- Schultz, R.M., Montgomery, R.R. and Belanoff, J.R. (1983). Regulation of mouse oocyte meiotic maturation : implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Develop. Biol.* 97, 264-273.
- Skoblina, M.N. (1969). Independence of the cortex maturation from germinal vesicle material during the maturation of amphibian and sturgeon oocytes. *Exp. Cell Res.* 55, 142-144.

- Smith, L.D. (1975). Molecular events during oocyte maturation. In : "The biochemistry of animal development" (R. Weber, ed), Vol. 3. pp. 1-46. Academic Press, New York.
- Smith, L.D. and Ecker, R.E. (1969). Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Develop. Biol.* 19, 281-309.
- Smith, L.D., and Ecker, R.E. (1970). Regulatory processes in the maturation and early cleavage of amphibian eggs. In current topics in developmental biology (A.A. Moscona, A. Monroyeds), Vol. 5. pp 1-38. Academic Presss, New York.
- Smith, L.D. and Ecker, R.E. (1971). The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Develop. Biol.* 25, 232-247.
- Speaker M.G. and Butcher, F.R. (1977). Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. *Nature* 267,848-849.
- Stambrook, C., and Velez, C. (1976). Reversible arrest of chinese hamster V79 cells in G2 by dibutyryl cyclic AMP. *Exp. Cell Res.* 99,57-62.
- Stith, B.J. and Maller, J.L. (1984). The effect of insulin on intracellular pH and ribosomal protein S6 phosphorylation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 102, 79-89.
- Stith, B.J. and Maller, J.L. (1987). Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Exp. cell Res.* 169,514-523.

- Theofan, G., and Goetz, F.W.(1981). The *in vitro* effects of actinomycin D and cycloheximid on germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 69A, 557-561.
- Thibier, C. Mulner, O. and Ozon, R. (1982). In vitro effects of progesterone and estradiol-17 $\beta$  on cholera toxin activated *Xenopus* oocyte adenylate cyclase. *J. Steroid Biochem.* 17, 191-196.
- Tokarz, R.R. (1978). Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. In "the vertebrate ovary : comparative biology and evolution (R.E. Jones, ed.), pp. 145-179. Plenum Press, New York
- Tovey, K.C., Oldham, K.G., and Whelan, J.A.M. (1974). A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chim. Acta* 56,221-234.
- Tso, J., Thibier, C., Mulner, O. and Ozon, R. (1982). Microinjected progesterone reinitiates meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79,5552-5556.
- Voogt, P.A. and De Groot, B.F. (1983). Stimulation of germinal vesicle breakdown in zebrafish oocytes by ovarian asterosaponins from the sea star *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74,419-424.
- Wasserman, W.J., and Masui, Y. (1975). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. *J. Exp. Zool.* 193,369-375.

Wells, J.N., and Kramer, G.L. (1981). Phosphodiesterase inhibitors as tools in cyclic nucleotide research : a precautionary comment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 231-9.