Université de Lille 1 U.F.R. de Biologie

Thèse de Doctorat Présentée et soutenue publiquement le 22 Octobre 2015 par **Mademoiselle GELAUDE Armance** En vue de l'obtention du grade de : Docteur de l'Université de Lille 1 Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.

École Doctorale Biologie santé Lille 1-Lille 2

RÔLE DE GAZOTRANSMETTEURS AU COURS DE LA REPRISE DE MÉIOSE ET DU DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DE XENOPUS LAEVIS

Le jury est constitué par

Professeur Isabelle FOURNIERPrésidente
Docteur Anthi KARAISKOURapporteur
Docteur Julien BOBERapporteur
Docteur Sabine MAZERBOURGExaminatrice
Professeur Jean-François BODARTDirecteur de Thèse
Docteur Alain MARTORIATIDirecteur de Thèse

RÉSUMÉ

Titre : Rôle de gazotransmetteurs au cours de la reprise de méiose et du développement précoce.

Les gazotransmetteurs sont impliqués comme seconds messagers dans de nombreux processus tels que l'inflammation, le cycle cellulaire ou la vasodilatation. La présence des enzymes responsables du métabolisme des gazotransmetteurs au niveau des organes de la reproduction humaine a ouvert la voie à de nouvelles études portant sur leur importance dans l'ensemble des processus impliqués dans la formation d'un organisme vivant. L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'effet de deux gazotransmetteurs, l'hydrogène sulfuré (H_2S) et le monoxyde d'azote (NO) sur la reprise de méiose, les effecteurs du cycle cellulaire et le développement précoce, en utilisant les propriétés et les avantages d'un modèle amphibien, le xénope.

Une précédente étude de notre équipe a démontré qu'un donneur de NO, le SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine), permettait la reprise de méiose en levant le second blocage physiologique en métaphase II de l'ovocyte de *Xenopus* (Jeseta et al. 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus précisément aux effets du NO sur les étapes plus précoces de la méiose (entre les blocages en prophase I et en métaphase II) de l'ovocyte de xénope (mécanismes moléculaires de régulation du cycle cellulaire et morphogenèse du fuseau). L'ensemble de cette étude avait pour but d'apporter des données supplémentaires concernant les mécanismes impliquant le NO dans la méiose des vertébrés. Nous avons pu démontrer, dans un premier temps, que le SNAP entrainait une inhibition de l'apparition de la tache de maturation, témoin de la reprise de méiose, par une diminution du pH du milieu de culture. L'utilisation du NAP, N-acétyl-D, L-pénicillamine disulfure, un produit de dégradation du SNAP ayant les mêmes caractéristiques moléculaires, mais ne libérant pas de NO, a mis en évidence une altération de la morphogenèse du fuseau de méiose dépendante de la libération de NO. Parallèlement, l'étude biochimique en cellule unique a permis de démontrer que les voies de signalisation, à savoir la cascade des MAPK et l'activation du MPF impliquées dans la reprise de méiose, étaient perturbées.

La maturation est un processus indispensable à la préparation de l'ovocyte à la fécondation. Ce phénomène est important afin de préparer, *in vitro*, les ovocytes à la fécondation dans le cadre de biotechnologies reproductives. Dans le cadre d'une comparaison avec d'autres modèle méiotique où le H₂S entraine des effets positifs sur la reprise méiose, nous nous sommes fixés comme objectifs d'étudier plus précisément les effets de ce gazotransmetteur sur les voies de signalisation impliquées dans la levée du blocage des ovocytes en prophase I, ainsi que ses effets sur la fécondation et le développement précoce des embryons de xénope. Deux mécanismes particuliers ont été mis en évidence : (1) une action d'inhibition de la reprise de méiose dépendante de la production de ROS ainsi (2) qu'une action sur l'un des acteurs majeurs de la boucle d'auto-amplification du MPF : Cdc25. Une étude approfondie de ces composés (MPF et Cdc25) a permis de définir que l'action du H₂S sur la boucle d'auto-amplification portait principalement sur la phosphatase. En effet, le MPF n'est ni dissocié, ni inactivé en présence de NaHS (donneur de H₂S), quelle que soit la concentration utilisée. Dans un second temps, nous avons démontré que le NaHS entraine une diminution du pourcentage de fécondation des ovocytes de xénope. De même, il entraine un retard du développement précoce de l'embryogenèse.

Nous avons ainsi pu démontrer des effets inhibiteurs de la reprise de méiose et du développement de deux gazotransmetteurs dans le modèle de l'ovocyte de xénope. De même, nous avons mis en évidence des cibles potentielles parmi les acteurs moléculaires. De façon surprenante, une étude de nos collaborateurs tchèques a démontré des effets inverses de l'hydrogène sulfuré sur la reprise de méiose de l'ovocyte de porc, effets relayés par une modulation des voies MPF et MAPK.

SUMMARY

Title: Study of gazotransmitters role in the meiosis resumption and early development of *Xenopus laevis*.

Gazotransmitters are involved as second messenger in many processes like response to the inflammation, cell cycle regulation or vasodilatation. The presence of the enzymes of gazotransmitters metabolism in the organs of human reproduction (testis, ovary, womb) has opened the way for new studies on the importance of gazotransmitters in oogenesis, fertilization and development. The aim of this thesis was to take benefit from the advantages of *xenopus* oocytes to assess the effects of two gazotransmitters: hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) on the resumption of meiosis, regulation of cell cycle effectors and early development (segmentation).

Because, previous studies from our team have showed that SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine), a NO donor, was able to allow meiosis resumption of metaphase to anaphase stage of *xenopus* oocytes (Jeseta et al. 2012), we focused our study on the effects of NO on the prophase-metaphase resumption in *xenopus* oocytes, concentrating on the molecular mechanisms and spindle morphogenesis. Thus, we aim at providing additional data to the mechanisms involving NO in meiosis of the vertebrates.

Either triggered by hormonal stimulation (progesterone) or by mature oocyte cytoplasm injection, Mphase entry was delayed by NO-donor SNAP: occurrence of white spot was delayed and spindle organization was disturbed. These phenomena did not seem NO sensitive. Effects on meiosis kinetics, and more precisely on the white spot appearance, were more likely to be attributed to pH changes than to NO release. The use of the NAP (N-acetyl- D, L -penicillamine disulfide) a SNAP degradation product with the same molecular characteristics, but any NO release, showed a NO-dependent alteration of the spindle morphogenesis. Together, these observations suggest that the NO would more specifically affect cytoskeletal proteins. Biochemical study in single cell has shown that signaling pathways, i.e. the cascade of MAPK and activation of MPF, involved in the resumption of meiosis were disrupted. A biochemical heterogeneity within oocytes population of the same experiment assumed that each oocytes responds in an independent way to SNAP.

Maturation is an essential process to prepare oocytes for fertilization. This phenomenon is important to prepare, *in vitro*, oocytes for reproductive biotechnology. Because of the lack of experimental knowledge, and to compare *xenopus* to porcine oocytes, in which H₂S have positive effects on meiosis resumption, maturation and fertilization, we studied more precisely the effects of this gazotransmitter on signaling pathways involved in the meiosis resumption of oocytes in prophase I stage, and its effects on fertilization and early development of *xenopus* embryos. Two mechanism have been highlighted: (1) a ROS-dependent inhibitory effects on meiotic resumption, as well as (2) an action on one of the major player in the auto-amplification loop of MPF: Cdc25c. A dose dependent inhibition of protein synthesis was also observed for the first time. No effect was observed on MPF: there was no dissociation or inhibition of its kinase activity. Then, we demonstrated that NaHS results in a decrease in the percentage of fertilization rate. Similarly, it caused a dose dependent delay on the early stages of embryogenesis.

We were able to demonstrate the inhibitory effects of the meiosis resumption and of the development by two gazotransmediators in the model of *xenopus* oocyte. Similarly, we have identified potential targets from molecular actors. Surprisingly, a study from our Czech colleagues showed the opposite effect of hydrogen sulfide on the resumption of meiosis in pig oocyte. This effect was mediated through modulation of the MAPK and MPF pathways in particular.

MOTS CLÉS

- Ovocytes
- Gazotransmetteurs
- Hydrogène Sulfuré
- Monoxyde d'azote
- Méiose
- Cycle cellulaire
- Transition G2/M
- Fécondation
- Développement précoce

KEY WORDS

- Oocytes
- Gazomediators
- Hydrogen Sulfide
- Nitric Oxide
- Meiosis
- Cell Cycle
- G2/M transition
- Fertilization
- Early Development

REMERCIEMENTS

"Never gonna give you up ; Never gonna let you down" Rick Astley

Ces trois années de thèse ne peuvent pas vraiment se résumer avec des mots, mais si je ne dois en retenir qu'un seul ce serait : merci.

Merci tout d'abord à mon jury de thèse et notamment à Madame Fournier d'avoir accepté de présider celui. Merci à madame Karaiskou et monsieur Bobe d'avoir pris le temps d'examiner mon manuscrit et de m'avoir ainsi permis de l'améliorer. Et merci madame Mazerbourg d'avoir examiné mon travail. Bien sûr à mes deux directeurs, sans qui tout cela n'aurait pas pu commencer et pas pu se terminer non plus. Merci à Monsieur Jean-François Bodart, tout d'abord de m'avoir tirée d'un très mauvais pas, d'avoir cru en moi, de m'avoir permis d'arriver là où je suis alors que j'avais baissé les bras et de m'avoir toujours encouragée. Je vous dois beaucoup. Merci pour votre patiente, votre plume et votre perspicacité. Merci Alain Martioriati, d'avoir répondu à mes questions les plus stupides, d'avoir subi mes longs discours me permettant de mettre mes idées en place et de m'avoir aiguillée quand je ne savais pas trop où j'allais. D'être quelqu'un d'aussi compréhensif aussi.

Merci aux autres membres du laboratoire, tous, car cette thèse c'est aussi grâce à vous que je peux la présenter aujourd'hui. Merci Katia, pour tes conseils et tes blagues, tes rires et délires. Pour ta vivacité d'esprit et tes conseils. Je te respecte et je t'admire vraiment. Merci Matthieu d'avoir été là pour moi, de m'avoir fait rire et de m'avoir écoutée quand je n'avais personne vers qui me tourner, merci pour ton amitié en somme. Merci Arlette, ma maman de secours, pour ta gentillesse, ton écoute, tes conseils et ton épaule quand j'en avais besoin. Il n'y a pas de mots pour te dire à quel point tu m'as aidée durant ces trois années aussi bien à tenir le coup, mais aussi à la paillasse. Merci Valérie pour ta patiente face à mon manque de savoir-faire administratif. A vous tous vous avez su me donner un courage que je n'avais pas et avez su me donner les clés qu'il me manquait pour me sentir un peu chercheur et non plus étudiant.

Merci aussi à mes amis, de m'avoir mis du soleil dans le cœur et du JdR plein la tête. Je pense à vous Pauline et Maud, ayant terminées avant moi cette épreuve, me permettant d'utiliser vos pas pour avancer plus facilement. Merci Julien, mon compagnon de galère, mon rocher dans la tempête, on l'écrira ensemble ce papier sur « les rapprochements sociaux qu'engendre un état de détresse mental ». Merci mes pôles poulettes, l'armée du Colonel Flacturne, mais aussi Marine, Jonas, Syrya, Sophie, Aurel et Tony pour votre soutien et votre grande capacité à me changer les idées. Merci tous les autres que j'oublie sûrement. Et merci, monsieur Slaby, le bureau est toujours plus agréable quand tu es là. A ton tour de vivre l'aventure qu'est la thèse, bonne chance et bon courage à toi !

Belone, tu n'as pas fini de m'entendre râler, mais au moins ce ne sera plus au sujet de ma thèse. Tu es ma petite sœur de cœur, merci d'avoir été là pour moi alors que ces années ne sont pas des plus faciles pour toi non plus. J'espère un jour pouvoir t'apporter autant de soutien que tu m'en as donné.

Zhl'ang, t'es pas un sentimentaliste je te dirai donc juste une chose : yé suis Sancho.

Merci aux plus importants de tous, mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Pas seulement parce que sans vous je n'existerais pas, mais aussi parce que sans vous je n'aurai jamais eu le courage d'aller aussi loin de mes études. Cette thèse elle est à vous aussi. Je vous aime de tout mon cœur. Vous êtes les meilleurs parents du monde et il n'y a pas plus à dire. Merci Mamie et Papy, mon grand frère aussi. Vous êtes là pour moi quoi qu'il arrive, vous m'aidez à grandir et je vous aime.

Merci Robin. Ai-je vraiment besoin de te dire pourquoi ? Pour toutes les larmes que j'ai versées, pour nos longues discussions quand je doutais, pour tes conseils, pour ton amour, pour la confiance en moi que tu me donnes... Pour nos rires, nos aventures, nos délires... Je t'aime tout simplement.

Merci Fred et Seb, Usul et Dorian, Links, Karim, Antoine Daniel, Matthieu Sommet, Dudu, la FK, les voxmaker et les autres de m'avoir accompagnées durant les heures de rédaction, les heures tardives au laboratoire et les moments de solitudes. Au fond vous aussi avez su me redonner le sourire. Mais aussi merci Leo Grasset, Bruce Benamran et Patrick Baud de m'avoir montré que la vulgarisation scientifique était un art, une passion et un chemin qu'il n'était pas si fou d'emprunter.

Je ne suis pas douée avec les mots, tout ça ne reflète pas toute la gratitude que j'ai pour vous tous. Merci.

Table des matières

RÉSUMÉ		3
SUMMARY		4
Mots clés		5
Key Words		5
Remerciemen	nts	6
Tables des fi	gures	14
Liste des tab	leaux	17
Liste des abb	réviations	
Objectifs		
Introduction		
Partie I : Le o	cycle cellulaire	
1.1. Les	différentes phases du cycle cellulaire	
1.2. Les	points de contrôle du cycle cellulaire	
1.3. L'ir	nterphase	
1.4. La l	Mitose	
1.5. La 1	néiose	
Partie II : L'o	ovocyte de xénope, un modèle d'étude du cycle cellulaire	
2.1. Le x	xénope	
2.2. L'o	vocyte de xénope : un modèle de gamète femelle	
2.2.1.	Classification ovocytaire	
2.2.2.	Caractéristiques de l'ovocyte de stade VI	
2.2.3.	Caractéristiques cellulaires et biochimiques de l'ovocyte de Xénope	
Partie III : La	a reprise de méiose des ovocytes de xénope	
3.1. Asp	ects cytologiques	
3.1.1.	Rupture de l'enveloppe nucléaire : GVBD	
3.1.2.	Morphogenèse du fuseau	
3.2. Asp	ects Biochimiques	
3.2.1.	Stimulation de la reprise méiotique	
3.2.2.	Les principaux acteurs	40
3.2.3.	Voies de signalisation déclenchées par la progestérone	
3.2.4.	Régulation des différents acteurs	
3.3. Arr	êt en Métaphase II	
3.3.1.	Caractéristiques	57
3.3.2.	Mos / MAPK	

3.3.	.3. Emi 2 (Early Mitotic Inhibitor 2)	58
3.3.	.4. Point de contrôle du fuseau	59
3.3.	.5. Cdk 2 / Cycline E	60
3.4.	Réponse à l'endommagement de l'ADN dans les ovocytes	60
3.4.	.1. Le DNA Damage Response	60
3.4.	.2. Les dommages à l'ADN induit par les ROS	62
3.4.	.3. L'ovocyte de xénope : un modèle p53 inactif	63
Partie IV	V : Les gazotransmetteurs	65
4.1.	Généralités	65
4.2.	L'hydrogène sulfuré	65
4.2.	.1. Généralités	65
4.2.	.2. Biosynthèse et Catalyse	66
4.2.	.3. Effets tissulaires	69
4.2.	.4. Effets sur la progression du cycle cellulaire	73
4.2.	.5. Modulation de l'activité protéique par S-Sulfhydration	76
4.3.	Le monoxyde d'azote	80
4.3.	.1. Généralités	80
4.3.	2. Biosynthèse et catabolisme	80
4.3.	.3. S-Nitrosylation	82
4.3.	.4. Effets tissulaires	82
4.3.	.5. Effet sur le cycle cellulaire, la croissance et la mort cellulaire	85
4.3.	.6. Effets du monoxyde d'azote sur la reproduction	87
RÉSUL	TATS	93
Effet du	NaHS sur la reprise de méiose et le développement précoce du xénope	94
1. Cor	ntexte	95
2. Obj	jectifs	95
3. Effe	ets du NaHS sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope	95
3.1.	Choix du donneur de H2S	95
3.2.	Le NaHS entraine une inhibition dose-dépendante de la reprise de méiose induit	e par
la pro	gestérone	96
3.3.	Les effets du NaHS ne sont pas dus à une augmentation de l'activité PKA	97
3.4.	Le NaHS est capable d'entrainer une inhibition de la synthèse protéique	98
3.5. dépen	Le NaHS empêche la reprise de méiose principalement par un mécanisme ROS- idant et l'inhibition de Cdc25c	98
4. Effe	et du NaHS sur le développement précoce du xénope	99
4.1.	Généralités sur le développement	99

4.2.	Le NaHS entraine une diminution du taux de fécondation.	
4.3.	Le NaHS entraine un retard de développement dépendant de la dose, ma	ais n'influe
pas s	ur l'apoptose	
PUBLI	CATION 1	
$1. H_2 S$	donor NaHS prevents meiotic resumption in a dose-dependent manner in	Xenopus
oocytes		
2. Joint Xenopu	inhibition of H2S metabolism key enzymes accelerates of the meiotic res	umption in
3. H ₂ S	donor effects are not related to PKA activity	
4. NaH	S impairs protein synthesis	
5. NaH	S abolishes self-amplification loop of MPF	
6. NaH	S does not dissociate the pre-MPF complex nor impact MPF activity	
7. NaH	S effects are partially ROS-dependent	
8. NaH	S does not promote nor protect from apoptosis	
RÉSUI	TATS SUPPLÉMENTAIRES	
1. Ef.	fet du GYY4137 sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope	
2. Le	NaHS entraine une inhibition de l'activité d'une Cdc25c humaine	
3. Étud	e préliminaire des effets du NaHS sur la fécondation des ovocytes et le dé	veloppement
de têtar	ds de xénope	
3.1.1	Le NaHS impact la fécondation des ovocytes de xénope	
3.2.1	Effet du NaHS sur le développement précoce des têtards de xénope	
4. Étud	e des effets du NaHS sur la transition G2/M du cycle cellulaire en cellules	s du cancer
du sein	(MCF-7).	
4.1.1	Recherche des concentrations de NaHS.	
4.2.]	Les concentrations de NaHS n'entrainent pas un arrêt marqué dans le cycl	e cellulaire
4.3.	L'utilisation de NaHS sur les cellules MCF-7 ne modifié pas leur profil bi	ocnimique.
5. Étud	e la S-Sulfhydration des protéines en présence de NaHS	
Effets of	lu NO sur la reprise de méjose des ovocytes de xénope	
1. Cont	exte	
2. Obie	ctifs	146
3. Le S	NAP. perturbateur de la reprise de méiose	
3.1	Choix du donneur de NO	146
3.2.	Le SNAP perturbe les évènements moléculaires et cellulaires de la reprint	ise de méiose
3.3.	Les effets du SNAP dépendent-ils d'une variation de pHi?	

3.4. L'altération de la morphogenèse du fuseau méiotique, un effet spécifique de l'augmentation de NO
Publication 2
1. NO-donor SNAP alters M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis induced by progesterone
2. NO-donor SNAP disturbs M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis induced by mature oocyte cytoplasm injection
3. Acid pH promoted by SNAP specifically inhibits the white spot appearance163
4. Atypical spindle assembly is NO release dependant164
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES
1. CPTIO : un contrôle négatif efficace ?179
Étude des effets de l'hydrogène sulfuré sur la maturation et l'activation de l'ovocyte de porc ainsi que sur le développement précoce des embryons
1. Contexte
2. Objectifs
3. L'expansion du cumulus d'ovocyte de porc
4. Métabolisme de H ₂ S dans l'ovocyte de porc (article 4)184
5. Le H ₂ S présente un effet antagoniste sur la reprise de méiose et l'expansion du cumulus de porc (article 3 et 4)
5.1. Le Na ₂ S, un donneur de H ₂ S, entraine une accélération de la reprise de méiose des ovocytes de porc (article 3)
5.2. Le Na ₂ S induit une diminution de l'expansion du cumulus et de la quantité de HA produite (article 3)
5.3. L'inhibition conjointe des enzymes du métabolisme du H ₂ S entraine une inhibition de la maturation ovocytaire (article 4)
5.4. L'inhibition conjointe des enzymes du métabolisme de l'H2S entraine la libération de HA dans le milieu (article 4)
6. Le H ₂ S module les profils d'activation du MPF et des MAPK186
6.1. Voies MAPK dans le modèle de l'ovocyte de porc186
6.2. L'activation du MPF et des MAPK est accélérée en présence de Na ₂ S186
6.3. L'activation du MPF et des MAPK est ralentie par l'inhibition conjointe des enzymes du métabolisme du H ₂ S (article 4)
7. Le Na ₂ S stimule la fécondation de l'ovocyte de porc (article 3)186
Article 3
1. H ₂ S Donor Accelerates Oocyte Maturation in a Dose-Dependent Manner
2. H ₂ S Donor Accelerates Porcine Oocyte Maturation
3. MPF and MAPK Activity Profiles Are Accelerated by H2S Donor
4. H ₂ S Donor Can Substitute for the Absence of Cumulus Cells

5. H ₂ S Donor Influences Cumulus Expansion with Presence of Oocytes	. 196
6. H_2S Donor Increases Activation Rate but It Has No Effect on Parthenogenetic	
Development	. 196
Article 4	. 207
1. Expression of hydrogen sulfide-releasing enzymes' genes in porcine oocytes	. 218
2. Observation of hydrogen sulfide-releasing enzymes in porcine oocytes	. 218
3. Hydrogen sulfide-releasing enzymes' inhibition suppresses maturation of porcine oocyt throughout MPF/MAPK activity	es . 218
4. Inhibition of hydrogen sulfide physiological production in porcine oocytes	. 219
5. Effect of inhibition of hydrogen sulfide production on cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes	. 220
resultats majeurs	. 243
1. Effets du NO et du H ₂ S sur la méiose de l'ovocyte de xénope	. 244
1.1 Effets d'un donneur de NO sur les ovocytes de xénope	. 244
1.2. Effets du donneur de H ₂ S sur les ovocytes de xénope	. 245
2. Effet de l'hydrogène sulfuré sur la reprise de méiose et l'expansion du cumulus des	246
2.1 Effets du NacS un donneur de HaS sur la renrise de méjose des ovocytes de norc e	. 240 t
l'expansion du cumulus	. 246
2.2 Effets des inhibiteurs du métabolisme du H ₂ S sur la reprise de méiose et l'expansion cumulus	n du . 246
3. Effets du H ₂ S sur la fécondation et le développement précoce	. 246
discussions, perspectives et conclusions	. 247
1. Altération du développement embryonnaire	. 248
1.1. Effets des gazotransmetteurs sur le développement embryonnaire	. 248
1.1.1. Fécondation et activation parthénogénétique	. 248
1.1.2. Organogenèse	. 248
1.2. Effets ROS dépendants des gazotransmetteurs	. 248
2. Comparaisons des différents modèles	. 249
2.1. Maturation ovocytaire	. 249
2.2. Fécondation	. 249
3. Cibles potentielles	. 251
3.1. Le NO et les protéines du cytosquelette	. 251
3.2. Les MAPKs, une autre cible potentielle du NO.	. 252
3.3. Cdc25c, une cible du H ₂ S ?	. 252
3.3.1. Différences xCdc25c et hCdc25c	. 252
3.3.2. Effet du H ₂ S par la S-Sulfhydration	. 254

3.3.3. ROS et Cdc25	
3.4. Interconnexion hydrogène sulfurée / Monoxyde d'azote	
3.4.1. Les phosphatases, une famille sous influence des gazotransmetteurs ?	
3.4.2. Effet potentiel de l'hydrogène sulfuré sur le monoxyde d'azote	
4. Conclusion générale	
Bibliographie	
Annexes	
Annexe 1 : Phosphatase assay OMPF.	
Annexe 2 : Biotine-Switch modifié	
Annexe 3 : Communications orales / par affiches	
Annexe 4 : Articles publiés	
RÉSUMÉ	

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du cycle cellulaire.

Figure 2 : Principaux points de contrôle du cycle cellulaire.

Figure 3 : Schéma de la mitose et de l'interphase.

Figure 4 : Schéma de la méiose.

Figure 5 : Photographies de Xenopus laevis.

Figure 6 : Classification ovocytaire de Dumont (1972)

Figure 7 : Représentation schématique d'un ovocyte au stade VI.

Figure 8 : Composants clés du fuseau.

Figure 9 : Morphogenèse du fuseau lors de la reprise méiotique ovocytaire.

Figure 10 : Représentation schématique de la structure des cyclines B.

Figure 11 : Mécanismes de régulation de la voie p38Mos-MEK1-MAPK lors de la reprise méiotique.

Figure 12 : Schéma de l'activation de la PKA.

Figure 13 : Concentration en MPF et cycline B au cours du cycle.

Figure 14 : Mécanisme de régulation du MPF par phosphorylation et déphosphorylation.

Figure 15 : Mécanismes de régulation de Cdc25c lors de la reprise méiotique des ovocytes de xénope.

Figure 16 : Schéma récapitulatif des évènements biochimiques intervenant dans la reprise de méiose de l'ovocyte de xénope.

Figure 17 : Implication d'Emi2 dans l'arrêt en métaphase II.

Figure 18 : De nombreux mécanismes de réparation de l'ADN sont à l'origine du maintien de la stabilité génomique.

Figure 19 : Voie d'apoptose p53 dépendante en réponse aux ROS.

Figure 20 : Métabolisme de l'H₂S.

Figure 21 : Biosynthèse et la dégradation de l'hydrogène sulfuré (H_2S) dans des cellules de mammifères.

Figure 22 : Effets inhibiteurs de composés organiques soufrés isolés de l'ail et l'oignon et criblés par Elodie Viry et al. 2010 pour l'inhibition Cdc25.

Figure 23 : Schéma simplifié du métabolisme du NO.

Figure 24 : Contrôle de dégradation de HIF- α par le NO.

Figure 25: Régulation de l'apoptose via TRX-ASK1.

Figure 26 : Schéma des effets du NO sur la reprise de méiose.

Figure 27 : Phénomènes de la reproduction régulés par le NO.

Figure 28 : Comparaison de la production de H₂S produit par le NaHS et le Na₂S.

Figure 29 : Schéma des voies biochimiques impliquées dans la reprise de méiose des ovocytes de xénope et mécanismes potentiellement sensibles aux NaHS.

Figure 30 : Différentes étapes du développement embryonnaires du xénope.

Figure 31 : Représentation de la gastrulation vue par l'hémisphère végétatif montrant l'évolution du blastopore depuis sa formation (stade encoche blastoporale) jusqu'à l'achèvement de la gastrulation (stade fente blastoporale)

Figure 32 : Schémas interprétatifs des mouvements du neurectoderme au cours de la neurulation sur des sections transversales d'embryons depuis le stade de la plaque neurale (PN) (1) jusqu'à la formation du tube neural (TN) (5).

Figure 33 : Schéma du phénomène d'équilibration. Un détail met en évidence la création de l'espace périvitellin qui désolidarise l'ovocyte de ses enveloppes. PA: Pôle Animal, PV: Pôle Végetatif.

Figure 34 : Photos des différents stades de développement de l'embryon de xénope.

Figure 35 : Photos des différents stades pouvant être observés après coloration au rouge nucléaire des ovocytes de xénope.

Figure 36 : Dosage de l'activité d'une GST-Cdc25c humaine en présence de NaHS à différentes concentrations.

Figure 37 : Effets du NaHS sur la fécondation.

Figure 38 : Effets du NaHS sur le développement.

Figure 39 : Exemple de têtard de 6 jours coloré au bleu alcian.

Figure 40 : Exemple de tête de têtard de 6 jours coloré au bleu alcian.

Figure 41 : Exemple de branchies et d'intestins de têtards colorés au bleu alcian.

Figure 42 : Quantification du nombre de cellules / mL en présence de NaHS à différents temps.

Figure 43 : Profil de libération du H_2S par le GYY4137 comparativement au NaHS et à un analogue non soufré, le ZYJ1122.

Figure 44 : Le NaHS ne perturbe pas la biochimie des cellules MCF-7.

Figure 45 : S-Sulfhydration des protéines totales.

Figure 46 : S-Sulfhydration de la protéine Cdc25c.

Figure 47 : Libération de NO par différents donneurs à différentes concentrations.

Figure 48 : Effet du CPTIO sur les effets du SNAP sur la reprise de méiose.

Figure 49 : Photographie des différents stades de la maturation ovocytaires de l'ovocyte de porc.

Figure 50 : Schéma représentatif des quantités relatives des ARNms des enzymes du métabolisme du H_2S au cours de la méiose.

Figure 51 : Récapitulatifs des effets du SNAP sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope.

Figure 52 : Récapitulatif des effets du H₂S sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope.

Figure 53 : Alignement de séquence de la Cdc25c humaine et de xénope. (Numéro swissport P30307 et P30309) utilisant le programme ClustalX.

Figure 54 : Mécanisme potentiel d'action du H₂S sur la phosphatase Cdc25c. Le H₂S pourrait entrainer une inhibition de la phosphatase Cdc25c par la production de ROS, directement par S-Sulfhydration de la cystéine 377 présente dans sa sous-unité catalytique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques des différents stades ovocytaires.

- Tableau 2 : Accumulation des différentes Cyclines B dans l'ovocyte de xénope.
- Tableau 3 : Récapitulatif des effets délétères du H₂S en fonction de sa concentration.
- Tableau 4 : Récapitulatif des effets de l'H₂S sur différents types cellulaires.
- Tableau 5 : Protéines subissant une S-Sulfhydration et conséquences.
- Tableau 6 : Gènes encodant les isoformes de NO synthases.
- Tableau 7 : Activités enzymatiques impliquées dans la S-Nitrosylation / De-Nytrosilation.

Tableau 8 : Récapitulatifs de la répartition des enzymes du métabolisme du NO au sein de différentes espèces.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AC : Adénylate cyclase

D

DDR : DNA Damage Response D.O. : Densité Optique DSP/DUSP : Dual-Specificity Phosphatase

Е

ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase EDRF : Endothelium-derived relaxing factor EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor eNOS : NO synthase endothéliale ErbB : Facteurs de Croissances Epidermiques

F

FAD : Flavine Adénine DinucléotideFGF : Fibroblast Growth FactorFSH : Follicle Stimulating Hormone

G

G0 : Gap 0
GAPDH : Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase
GS : Glutathion-Synthétase
GSH : Glutathion Réduit
GSK3β : Glucogène Synthetase Kinase 3β
GSNOR : S-Nitrosoglutathione Réductase
GSSG : Glutathion Oxydé
GTP : GuanosineTriphosphate
GVBD : Germinale Vesicule Breakdown
Gwl : Greatwall

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique APC/c : Anaphase Promoting Complexe / Cyclique ARNm : Acide RiboNucleique messager ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated gene

B

BER : Base Excision Repair BH4 : Tétrahydrobioptérine

С

CaM : Calmodulines

CAK : Cdk Activating Kinase

CamKII : Calcium/calmoduline-dependent Kinase II

CAT : Cystéine Aminotransférase

CBS : Cystathionine- β -Synthase

Cdc : Cell Division Cycle

Cdk : Cycline Dependent kinase

CDO: Cystéine Dioxygénase

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

c-GCS : C glutamyl cystéine synthétase

Chk1,2 : Checkpoint Kinase 1,2

CKI : Cdk Inhibitor

CL : Cystéine Lyase

CPE : Cytoplasmic Polyadenylation Element

CPEB : Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein

CPSF : Clevage and Polyadenylation Specificity Factor

CRS : Cytoplasmic Retention Signal

 $CSE: Cystathionine \hbox{-} \gamma \hbox{-} Lyase$

CSF : Cytostatic Factor

H

H₂S : Hydrogène Sulfide hCG : Hormone chorionique gonadotrope humaine hEGFR : Humain Epithelial Growth Factor HEK-293 : Human Embryonic Kidney hNGF : Human Nerve Growth Factor HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

I

IGF1 : Insulin Growth Factor 1 IGFR : Insulin Growth Factor Receptor IKCa : conductance intermédiaire des canaux potassiques activés par le calcium iNOS : Inducible NO Synthase I/R : ischémie / reperfusion

J

JNK : Jun N-terminal protein Kinase

K

KATP : canaux potassiques sensibles à l'ATP Keap1 : Kelch like ECH-associated protein 1

L

LH : Hormone Lutéinisante LTP : Potentialisation à Long Terme

M

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase MAPs : Microtubule Associated Protein MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7, MEK/MKK : MAPK/Erk protein Kinase Mos : Moloney Sarcoma MPF : M-Phase Promoting Factor MPST : 3-mercapto-sulfurtransferase (3-MPST) MTOC : Centre Organisateur des microtubules

Ν

NAPDH : β-nicotinamide adénine dinucléotide NES : Nuclear Export Signal NF-KB : Nuclear Factor-Kappa B NHEJ : Non Homologous End-Joining nNOS : Neural NO Synthase NO : Nitric Oxide / Monoxyde D'azote

Р

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PERK : Kinase du Réticulum Endoplasmique de type protéine kinase
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PKA : Protéine Kinase A
Plkk1 : Xenopus Polo-like kinase Kunase 1
Plx1 : Polo-like kinase *Xenopus*PP1: Protein Phosphatase 1
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PPase : Proteine Phosphatase
PRE : Polyadenylation Response Element
Prog / PG : Progestérone
PTP : Protein Tyrosine Phosphatase

R

RINGO : Rapid Inducer of G2/M progression ROS : Reactive Oxygen Species Rsk : Ribosomal S6 subunit protein kinase

S

SAC : Spindle Assembly Chekpoint

SDS-PAGE : Sodium Deodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SiRNA : Small Interfering ARN

SKCA : Small conductance canaux potassiques activés par le calcium

Т

TMA : Réseau de Microtubule Transitoire ; Transitent Microtubule Array

TSMT : Thiol S-Méthyltransférase

U

U0126 : U0126 ethanolate

UTR : Untraslated Region

V

VEGFR1 : Récepteur Vasculaire de facteur de croissance de l'Endothélium 1

VG : Vésicule Germinative

W

WS : White Spot

Х

xAR : *Xenopus* Androsterone Recpetor
XErp1/Emi 2 : Early Mitotic Inhibitor 2
Xp42Mpk1 : *Xenopus* protein 42 Kda MAPK
XPR : *Xenopus* Progesterone Receptor

OBJECTIFS

L'hydrogène sulfuré (H₂S) et le monoxyde d'azote (NO) sont deux gazotransmetteurs dont les enzymes régulant le métabolisme sont détectées dans de nombreux tissus, dont les organes de reproduction (NO REF ; H₂S REF). Plusieurs études, sur des modèles invertébrés (Mohri et al., 2008; Leckie et al., 2003; Kuo et al., 2000) et vertébrés (Jeseta et al., 2012; Hyslop et al., 2001; Petr et al., 2005), ont été menées quant au rôle du NO dans la levée du blocage en métaphase. Si la potentialité du NO à lever ce blocage en métaphase II a été étudiée dans les ovocytes de Xénope, révélant qu'un donneur de NO est capable d'induire une parthénogenèse atypique (Jeseta et al., 2012), le rôle du NO au cours de la reprise de la méiose n'a pas été exploré. Si les enzymes régulant le métabolisme de H₂S sont détectés dans les testicules (Oi et al., 2001), peu de données sont disponibles quant au rôle de H₂S au cours de la méiose et des étapes précoces du développement. Néanmoins, un rôle potentiel pour H₂S au cours de la méiose a été relevé dans les souris ko. pour CBS (Liang et al., 2007). Cependant à ce jour peu de données existent sur l'implication des gazotransmetteurs au niveau des gamètes.

L'ovocyte de Xénope offre un contexte expérimental de synchronisation physiologique en G2/M (reprise de méiose) ou en métaphase/anaphase (fécondation, parthénogenèse). En outre, la réponse à l'endommagement de l'ADN n'est pas active ce modèle et nous permet de déterminer les effets directs des gazotransmetteurs sur les effecteurs du cycle cellulaire, en excluant tout effet génotoxique. Le but de cette étude étant d'apportés des données supplémentaires aux mécanismes liant gazotransmetteurs et gamètes.

L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer les rôles du NO et de H_2S au cours de la méiose ovocytaire et du développement précoce, de circonscrire les mécanismes ciblés par ces gazotransmetteurs.

- La première étape a été de déterminer les mécanismes d'action du NO sur la reprise de méiose : afin d'étudier ces mécanismes, des ovocytes ont été maturé en présence d'un donneur de NO, le SNAP (s-Nitroso-n-Acetyl Penicillamine), à différentes concentrations. Différents paramètres ont été étudiés et analysés : rupture de l'enveloppe nucléaire, morphogenèse du fuseau méiotique, activations des voies MAPK et MPF.

- La deuxième étape s'est focalisée sur les effets de H₂S sur l'entrée en phase M, la transition métaphase-anaphase et le développement précoce. Dans ce cadre, le donneur de H₂S NaHS, a été utilisé. Les analyses biochimiques et morphologiques ont permis de tester plusieurs niveaux d'action : mécanismes AMPc-dépendants, mécanismes ROS (Reactive Oxygen Species)- dépendants et boucle d'auto-amplification du MPF.

- Puisque le monoxyde d'azote est connu pour inhiber l'activité phosphatase de Cdc25 (Majumdar et al., 2012) et que nos résultats ont souligné la sensibilité de la boucle d'auto-amplification du MPF au H2S, les effets de l'hydrogène sulfuré sur l'activité Cdc25 ont été étudiés. Pour cela une Cdc25C humaine purifiée a été incubée en présence de NaHS et son activité a été mesurée. La S-sulfhydration altérant plusieurs protéines dont les phosphatases (Protein Tyrosine Phosphatases, PTP) l'action du H₂S sur d'autres phosphatases a été envisagée.

- Le NaHS a été utilisé dans le cadre de fécondation afin de déterminer si le H₂S pouvait altérer le développement précoce des ovocytes de xénope.

Enfin, le NaHS a été utilisé sur des lignées de cancer du sein, afin d'évaluer les effets
 d'une variation de H₂S et de déterminer si les résultats obtenus avec le modèle amphibien
 étaient analogues aux résultats obtenus avec des lignées cellulaires de cancer du sein.

Notre étude a été réalisée en collaboration avec les Dr Jan Nevoral et le Pr Marketa Sedmikova, du Département des Sciences Vétérinaires de l'Université des Sciences de la Vie de Prague, où des expérimentations sur le modèle ovocyte de porc ont été réalisées en parallèle.

INTRODUCTION

Partie I : Le cycle cellulaire

1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire

La division cellulaire est une caractéristique fondamentale de tout organisme vivant. La majorité des cellules différenciées sont dans un état latent et ne se divisent pas. Elles sont considérées dans un état de quiescence (phase G0 ou Gap 0). Après stimulation, ces cellules peuvent reprendre leur division et entrer de nouveau dans un cycle cellulaire à l'issue duquel deux cellules filles génétiquement identiques seront formées.

Le cycle cellulaire peut être découpé en deux phases principales : l'interphase et la division cellulaire. L'interphase, durant laquelle la division cellulaire est préparée, regroupe une phase de réplication de l'ADN par un mécanisme semi-conservatif (phase de synthèse ou phase S) et deux phases de croissance et de synthèse protéique (phase G1 ou G2) (Figure 1). La division cellulaire correspond à la ségrégation des chromosomes dans deux cellules filles (phase de mitose ou phase M). La mitose se découpe elle-même en différentes phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase qui seront décrites plus en détail par la suite. La durée du cycle cellulaire varie en fonction de l'espèce et du type cellulaire. Une cellule humaine en culture se divise en environ 24h tandis qu'une levure bourgeonnante se sépare au bout de 90 minutes.



1.2. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Afin d'assurer la formation de cellules filles viables et fonctionnelles, le cycle cellulaire est régulé par le franchissement de différents points de contrôle ou « check point », notamment lors des transitions G1/S, G2/M et métaphase-anaphase. Ils permettent la surveillance d'aspects

fondamentaux comme l'achèvement total de la réplication avant l'entrée en mitose (Replication Checkpoint) ou encore le bon positionnement de tous les chromosomes sur la plaque métaphasique avant la séparation des chromatides sœurs (Spindle Assembly Checkpoint). Au cours du cycle cellulaire, l'intégrité de l'ADN est vérifiée par la machinerie moléculaire du DNA Damage Response (DDR). Si des anomalies sont détectées, et ne peuvent être réparées, la cellule s'orientera vers un processus de mort cellulaire.



Figure 2 : Principaux points de contrôle du cycle cellulaire.

L'étude du cycle cellulaire a fait l'objet de travaux récompensés par un prix Nobel en 2001 (Leland Hartwell, Sir Tim Hunt et Sir Paul M. Nurse). Le contrôle du cycle cellulaire est réalisé principalement *via* les activités de complexes Cdk/Cycline qui le régulent, mais sont ellesmêmes régulées. Il en existe plusieurs ; elles interviennent tout au long du cycle dans un ordre déterminé (Figure 2). La succession normale des différentes phases ne peut avoir lieu que si les différentes Cdk (Cycline Dependant Kinase) intervenant au cours des différentes phases sont présentes et actives aux moments opportuns. La régulation des Cdk/Cycline se fait (i) par une alternance synthèse/dégradation de la cycline, les sous-unités régulatrices du complexe, (ii) l'interaction entre les Cdk et les CKI (Cdk Inhibitor) et (iii) des mécanismes de modifications post-traductionnelles (phosphorylations / déphosphorylations des Cdk, ubiquitinylation des cyclines, par exemple).

1.3. L'interphase

L'interphase couvre, en général, 90% de la durée totale du cycle. Des exceptions existent : les cellules souches et les cellules embryonnaires qui subissent des divisions successives durant lesquelles l'interphase est réduite. C'est durant cette phase que la plupart des constituants cellulaires sont synthétisés de façon continue. Seule la synthèse d'ADN échappe à cette règle, car elle a lieu exclusivement durant la phase S de l'interphase. Les deux brins d'ADN sont dupliqués, assurant la formation de deux chromatides identiques par chromosome.

Les cellules somatiques se divisent, croissent et conservent leur taille finale, au contraire des cellules embryonnaires précoces qui, elles, subissent des divisions rapides aboutissant à la formation de cellules de taille décroissante (blastomères). La création de cellules de même taille nécessite une synthèse protéique. La phase S est alors encadrée de deux phases G de croissance ou de préparation à la mitose.

1.4. La Mitose

La mitose, phénomène court d'une heure en moyenne, a, pour finalité, de diviser chaque cellule diploïde en deux cellules filles dont le matériel génétique sera strictement identique à celui de la cellule mère.



Figure 3 : Schéma de la mitose et de l'interphase (adapté depuis site de l'université d'Angers) La mitose se compose de cinq différentes étapes : (1) la prophase, (2) la pro-métaphase, (3) la métaphase, (4) l'anaphase et (5) la télophase. Durant l'ensemble de ce phénomène, la cellule voit ses chromosomes se condenser et s'aligner sur la plaque métaphasique avant que les chromatides sœurs ne soient séparées et permettent de composer deux nouveaux nuclei. La cellule mère se divise alors pour former deux nouvelles cellules filles qui verront leur ADN être répliqué avant la prochaine mitose.

Le comportement des chromosomes durant la mitose permet de définir, *a minima*, quatre étapes essentielles (Figure 3) :

- La prophase : les chromosomes à deux chromatides sœurs apparaissent suite à la condensation de la chromatine. On observe aussi une désagrégation de la membrane nucléaire. Le fuseau de division, constitué par des microtubules polaires, s'assemble à partir du centre organisateur (les centrioles) par polymérisation de tubulines.
- La pro-métaphase : l'enveloppe nucléaire disparait.
- La métaphase : es chromosomes s'alignent à l'équateur de la cellule pour former la plaque équatoriale.
- L'anaphase : les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles.

• La télophase : les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme. Le nucléole réapparait tandis que le fuseau de division disparait. La division du cytoplasme (ou cytodiérèse ou cytocinèse ou plasmodiérèse) aboutit à l'individualisation de deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère.

1.5. La méiose

La méiose, qui se produit dans les cellules germinales, est constituée de deux divisions successives qui permettent de passer de 4n chromosomes à 2n chromosomes: (1) une division réductionnelle durant laquelle les chromosomes homologues se répartissent dans deux cellules distinctes, et (2) une division équationnelle qui donnera deux cellules filles à n chromosomes à une chromatide, ce qui correspond, par exemple, au noyau gamétique (Figure 4). Ces deux divisions se succèdent sans interphase, ni réplication de l'ADN. Celle-ci va permettre la production des gamètes, cellules reproductrices haploïdes arrivées à maturité, capables de fusionner avec un autre gamète du type complémentaire, afin de former un zygote diploïde.



Figure 4 : Schéma de la méiose. Les chromosomes rouges représentent les chromosomes d'origine maternelle, les chromosomes bleus ceux d'origine paternelle. Lors de la division, les chromosomes forment parfois des chiasmas, enjambement de chromatides paternelles et maternelles. À ce niveau ont parfois lieu des crossings over, échanges de portions de chromatides. La méiose se compose ensuite de deux divisions successives sans duplication de l'ADN, l'une réductionnelle, l'autre équationnelle, donnant lieu à la formation des gamètes.

Partie II : L'ovocyte de xénope, un modèle d'étude du cycle cellulaire

2.1. Le xénope

L'espèce *Xenopus laevis* appartient à la famille des pipidés. Elle se classe parmi les batraciens Anoures. Surnommée « crapaud à griffes », cette espèce vit en Afrique du Sud. Elle est exclusivement aquatique dans le sens où elle y nait, y vit, s'y nourrit et s'y reproduit. Les xénopes possèdent une ligne latérale comparable aux poissons. Ces animaux ont des pattes arrière musculeuses dont les trois doigts portent des griffes cornées. Leur peau est perméable aux échanges gazeux et hydriques. Le mode de reproduction est externe : les œufs sont pondus sous forme de grappes dans l'eau, puis immédiatement fécondés par le mâle, accouplé à la femelle par amplexus. Il existe un dimorphisme sexuel : la femelle xénope, plus grande que le mâle, mesure environ 11 cm du rostre au cloaque tandis que le mâle adulte présente des callosités rugueuses sur les membres antérieurs (Figure 5).



Figure 5 : Photographies de *Xenopus laevis*. À droite : mâle ; à gauche : femelle. Les femelles sont plus grosses que les mâles et ne possèdent pas, entre autres, de palpes reproducteurs

2.2. L'ovocyte de xénope : un modèle de gamète femelle

Les études réalisées sur le modèle « amphibien » ont largement contribué à élargir la compréhension des mécanismes moléculaires de la régulation du cycle cellulaire (Masui & Markert 1971; Bodart et al. 2002; Pfeuty et al. 2012; Dunphy et al. 1988; Haccard & Jessus 2006). L'ovocyte de xénope, est un modèle d'étude de la transition G2/M du cycle cellulaire.

2.2.1. Classification ovocytaire

Les ovaires contiennent une population hétérogène d'ovocytes en raison de la progression asynchrone de l'ovocyte dans l'ovogenèse. Une classification en six stades a été proposée en fonction de la taille et de la pigmentation des cellules (Dumont, 1972) (Figure 6 ; Tableau 1). La maturité sexuelle de l'ovaire est obtenue en 3 à 6 mois. Les ovocytes de stades I et II sont dépigmentés. Dès le stade III des granules pigmentaires contenant de la mélanine se déposent uniformément au niveau du cortex de l'ovocyte. Le stade IV montre une différence entre l'hémisphère animal, hémisphère pigmenté, et végétatif incolore. La densité des pigments est à corréler avec la polarité de l'ovocyte. Les stades VI sont caractérisés par la présence d'un anneau dépigmenté au niveau de la zone équatoriale. Seuls les ovocytes de stades V et VI sont compétents pour répondre à une stimulation hormonale induisant la reprise de méiose (Chesnel et al., 1992; Schorderet-Slatkine and Drury, 1973).



Figure 6 : Classification ovocytaire de Dumont (1972). L'ovogenèse est divisée en 6 stades définis essentiellement par la taille et la pigmentation de l'ovocyte

 Tableau 1 : Caractéristiques phénotypiques des différents stades ovocytaires. D'après la classification de Dumont (1972)

Stades	I	II	III	IV	V	VI
Tailles (µM)	50-300	300-450	450-600	600-1000	1000-1100	1100-1300
Pigmentation	Clair Transparent	Blanc Opaque	Marron clair Homogène	Concentration des pigments noirs au niveau de l'hémisphère animal	Hémisphère animal marron Hémisphère végétatif clair	Anneau équatorial non pigmenté entre les hémisphères

2.2.2. Caractéristiques de l'ovocyte de stade VI

Les ovocytes de stade VI sont bloqués en Prophase I de première division de méiose. L'ovocyte de stade VI se compose de trois zones bien distinctes : un hémisphère animal de couleur marron, un hémisphère végétatif de couleur beige claire / et un anneau équatorial blanc. Ces cellules géantes (de 1,1 à 1,3 mm de diamètre) et volumineuses (~1 μ L) sont dites hétérolécithes. Ce terme désigne les œufs dont le vitellus est réparti de façon inégale et subissant de fait une segmentation inégale lors du développement embryonnaire précoce. On observe donc chez ces ovocytes deux types de gradients qui polarisent la cellule : un gradient vitellin auquel s'oppose un gradient de protéines et d'acides nucléiques qui servent de réserves informatives (Figure 7).

Cytoplasme

Le cytoplasme contient de nombreux ribosomes dont seulement 2% sont impliqués dans la traduction. Le reste des ribosomes formera un stock fonctionnel ultérieurement. De même, seuls 20% des ARNm (Acide RiboNucleique messager) sont traductibles, le reste se trouvant à l'état latent. Ces ARNm, organisés en gradient inverse au gradient vitellin, sont nécessaires aux premières divisions de segmentation, à la réplication, à la traduction et au contrôle de la destinée des cellules. Ce gradient d'ARNm sert de déterminants cytoplasmiques. Les cellules qui héritent d'ARNm particuliers s'engageront dans des voies de différenciation spécifiques au cours de l'embryogenèse.





L'axe antéro-postérieur de l'embryon est défini de façon très précoce. Le pôle animal formera la partie antérieure de l'embryon tandis que le pôle végétatif constituera la partie postérieure de l'embryon. On retrouve donc une localisation précise de nombreux ARNm indispensables à la différenciation de ces différents axes. On peut citer l'exemple le plus connu, Vg1. L'ARNm Vg1 est localisé du côté postérieur, impliqué dans l'induction du mésoderme. (Deshler et al., 1997).

Les organites se répartissent eux aussi de manière particulière. Les mitochondries et les granules corticaux (vésicules contenant des enzymes, des glycoprotéines et des mucopolysaccharides)

se répartissent en périphérie, au niveau du cortex. Dans l'hémisphère animal des granules pigmentaires contenant de la mélanine sont présents au niveau du cortex, donnant la couleur au pôle.

Noyau ou vésicule germinative :

La vésicule germinative (VG) est plus volumineuse qu'un noyau de cellule somatique (40 à 50 fois plus grosse). Elle est visible sous loupe binoculaire et peut être sortie de l'ovocyte permettant l'utilisation d'ovocytes énucléés. Elle renferme le nucléoplasme avec les chromosomes et le matériel nucléaire. On compte 18 paires de chromosomes, l'ovocyte de xénope est donc polyploïde de type allotetraploïde. La polyploïdie du genre *xenopus* résulterait de l'hybridation de deux espèces proches. Cependant, dans ce cas, le croisement fondateur n'est pas déterminé. On observe alors plusieurs jeux de chromosomes qui coexistent. On retrouve aussi dans cette vésicule germinative 1500 nucléoles renfermant la copie des gènes codant pour les ARNr ainsi que de nombreuses protéines stockées pour la maturation finale de l'ovocyte et le développement de l'embryon.

2.2.3. Caractéristiques cellulaires et biochimiques de l'ovocyte de Xénope

L'ovocyte de xénope présente de nombreuses propriétés cellulaires et biochimiques particulièrement adaptées pour l'étude de cycle cellulaire. Ces cellules géantes sont facilement manipulables (micro-injection et électrophysiologie). Elles montrent une grande capacité de synthèse protéique et contiennent un taux élevé de protéines permettant l'analyse cellule par cellule *via* la technique d'immuno-empreinte (Ferrell and Machleder, 1998; Liu, 2006). La population d'ovocytes dans l'ovaire est naturellement synchronisée en prophase I de méiose. La reprise du cycle cellulaire peut être induite *in vitro* par une simple stimulation hormonale (progestérone ou insuline). La reprise du cycle cellulaire est aussi obtenue en surexprimant certains effecteurs des voies de signalisation impliquées dans la reprise méiotique telles que les MEK (MAPK/Erk protein Kinase), composants de la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Bodart et al., 2002a; Haccard et al., 1993).

Partie III : La reprise de méiose des ovocytes de xénope

La maturation est définie comme l'ensemble des évènements morphologiques, cytologiques, biochimiques et ioniques conduisant l'ovocyte de son premier blocage en prophase I à un second blocage en métaphase II. Cette maturation permet de préparer l'ovocyte à la fécondation et à son activation. Il a été récemment mis en évidence qu'en absence de fécondation, ces cellules bloquées en métaphase II subissent une mort cellulaire par apoptose.

3.1. Aspects cytologiques

3.1.1. Rupture de l'enveloppe nucléaire : GVBD

L'évènement le plus précoce de la reprise de méiose est la rupture de l'enveloppe nucléaire. Dans les premières heures qui suivent la stimulation hormonale, on peut observer la rupture de la vésicule germinative qui a lieu à sa base du côté le plus proche de l'hémisphère végétatif (Brachet et al., 1970; Huchon et al., 1981). Simultanément se forme, à la base du noyau, un réseau de microtubules transitoires (TMA). Le TMA se forme à partir du centre organisateur des microtubules ou MTOC. La vésicule migre ensuite en direction du pôle animal de l'ovocyte. Au niveau de ce pôle, on observe alors une réorganisation des pigments entrainant l'apparition d'une tache de maturation (ou White Spot) (Huchon et al., 1981; Gard, 1992). Cette tache blanche est un signe morphologique évident de la reprise de méiose, détectable sous loupe binoculaire.

3.1.2. Morphogenèse du fuseau



3.1.2.1. Composant clé du fuseau

Figure 8 : Composants clés du fuseau. Les microtubules sont affichés en gris et composés des microtubules du fuseau antiparallèle, des microtubules du kinétochore (Fibre K), et les microtubules astraux qui s'étendent à l'écart des pôles du fuseau. Les chromosomes dupliqués sont composés de deux chromatides sœurs fortement liées dans la région du centrosome où chaque brin sœur est lié à un kinétochore qui attache les chromosomes aux microtubules. Différentes protéines motrices sont visibles.

Elles ont pour rôle de déplacer les kinétochores et les bras des chromosomes, et de réguler la dynamique des microtubules aux extrémités. L'extrémité (+) se trouve proche des chromosomes alors que l'extrémité (-) est proche des centrosomes.

Les Microtubules

Le fuseau est composé majoritairement de microtubules. Ces filaments polarisés sont constitués d'hétérodimères d' α/β tubuline. Trente profilaments parallèles s'associent latéralement pour former la structure cylindrique creuse caractéristique.

Ces microtubules présentent deux propriétés fondamentales leur propriété dynamique et leur polarité structurale. La première se définit comme étant leur capacité à s'allonger et se raccourcir *via* l'addition ou la perte de dimères de tubuline à leur extrémité (Desai and Mitchison, 1997). Les microtubules varient naturellement entre un état de croissance ou de rétrécissement, phénomène connu sous le nom d'instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984). Cette dynamique est régulée par les MAPs (Microtubule Associated Protein) responsables de la stabilité des microtubules. Ces facteurs sont essentiels au cours de la mitose, moment où la dynamique des microtubules augmente en comparaison avec l'interphase (Saxton et al., 1984). La polarité des microtubules s'explique par l'asymétrie des sous-unités de la tubuline, entrainant une dynamique différente des extrémités (+) et (-) des microtubules. Cette propriété permet notamment le déplacement des protéines motrices telles que la dynéine ou des protéines kinesine-like capables de reconnaitre la polarité des microtubules et de se déplacer, elles et leur chargement, sur ceux-ci (Wittmann et al., 2001). Elles transportent notamment les chromosomes, les microtubules qui sont triés et organisés au sein de la structure, et d'autres complexes de protéines.

Il est à noter que dans les ovocytes, le MTOC n'est pas constitué de centrosomes (Figure 8). La formation du fuseau est alors dite acentriolaire.

Les chromosomes et les kinétochores

Longtemps les chromosomes ont été considérés comme des participants inactifs de la formation du fuseau. Ce fait était supporté par une étude démontrant que l'on pouvait observer la formation du fuseau en absence de chromosomes, ceux-ci ayant été remplacés par des billes de chromatine dans des extraits d'œufs de xénope (Heald et al., 1996). Cependant, par la suite, il a été démontré que les chromosomes contribuent à la nucléation et la stabilisation des microtubules durant l'assemblement du fuseau (Bucciarelli et al., 2003).

Les chromatides sœurs présentent un kinétochore au niveau du centrosome, à savoir un complexe moléculaire permettant l'interaction des microtubules de type fibre-K avec le chromosome. Cette interaction est cruciale pour le mouvement des chromosomes et la ségrégation. Ils sont aussi impliqués dans la régulation du checkpoint d'assemblement du fuseau. Ils contrôlent la liaison des chromosomes au fuseau et bloquent la phase M jusqu'à ce que l'ensemble des chromosomes soit correctement fixé, mais aussi correctement aligné et orienté (Chan et al., 2005).

3.1.2.2. Morphogenèse du fuseau acentriolaire



http://biologylabs.utah.edu/gard/HTML/Oogenesis/Maturation_body.html.

De façon simultanée à la GVBD (Germinale Vesicule Breakdown), on observe la formation d'un réseau microtubulaire transitoire nommé TMA (Transient Microtubule Array) à partir du centre organisateur des microtubules. Ce TMA migre vers le pôle animal en association avec les chromosomes et on observe un réarrangement pigmentaire à l'origine de la tache de maturation.

Quatre étapes peuvent être observées durant la formation du fuseau (Gard, 1992) :

- 1. Le complexe MTOC-TMA se condense pour former un agrégat microtubulaire compact en forme de disque.
- 2. La réorganisation de cet agrégat aboutit à la formation d'un fuseau de petite taille bipolaire.
- 3. Le fuseau s'allonge.
- 4. Une rotation du fuseau. En raison de l'absence de centriole et de centrosome (Huchon et al., 1981), le fuseau méiotique a un aspect différent du fuseau mitotique. On parle d'un aspect en tonnelet. Durant la prométaphase, le fuseau
méiotique, d'abord orienté transversalement, pivote et s'oriente perpendiculairement à l'axe pôle animal/végétatif puis s'ancre à la membrane plasmique de l'ovocyte.

La seconde division de méiose se bloque ensuite en métaphase II jusque-là fécondation. On peut observer le premier globule polaire, témoin de la première division de méiose ainsi qu'un fuseau ancré à la membrane au centre de la tâche de maturation.

3.2. Aspects Biochimiques

3.2.1. Stimulation de la reprise méiotique

3.2.1.1. La progestérone et ses récepteurs

La maturation ovocytaire est induite, *in vivo*, par un signal hormonal. De nombreuses hormones stéroïdes sont capables de déclencher la reprise de méiose, mais l'hormone principale de la maturation est la progestérone, produite par les cellules folliculaires. Les gonadotrophines synthétisées par l'hypothalamus stimulent la production d'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse ce qui stimule cette synthèse de la progestérone (Fortune et al., 1975).

Le récepteur qui déclenche la maturation induite par la progestérone n'est pas un récepteur à hormone stéroïde conventionnel : il ne réside pas dans le cytoplasme ou le noyau. En effet, de la progestérone injectée dans l'ovocyte de *Rana pipiens* (Masui and Markert, 1971; Smith and Ecker, 1971, 1969a) ou de *Xenopus laevis* (Jacobelli et al., 1974) est incapable d'induire la reprise de méiose. À l'inverse, des billes « coatées » avec de la progestérone (Ishikawa et al., 1977) ou des polymères synthétiques de hauts poids moléculaires incapables de pénétrer dans l'ovocyte (Godeau et al., 1978; Bandyopadhyay et al., 1998; Baulieu et al., 1978) mis en contact avec l'extérieur de l'ovocyte induisent la reprise de méiose. Le récepteur à la progestérone est donc membranaire et externe.

Contrairement aux hormones stéroïdes conventionnelles dont les effets passent par une régulation de la transcription, la progestérone peut induire la reprise de méiose dans des ovocytes énucléés (Schorderet-Slatkine and Drury, 1973). De même, la reprise méiotique induite par la progestérone n'est pas affectée par l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. Les effets seraient donc post-transcriptionnels (Masui and Markert, 1971; Smith and Ecker, 1969b).

Le récepteur à la progestérone des ovocytes de xénope est un récepteur à sept domaines transmembranaires et est couplé à une protéine G de type G_0 , G_1 ou G_2 . Les évènements biochimiques précoces de la réponse des ovocytes exposés à la progestérone impliquent une protéine G couplée à un récepteur causant une inhibition de 50% de l'activité AC (adénylate cyclase) (Sadler and Maller, 1981) et une baisse de 20 à 80% de la concentration AMPc (Adénosine Monophosphate Cyclique) (Maller et al., 1979).

Les ovocytes de stades V et VI sont qualifiés de compétents, signifiant qu'ils sont capables de reprendre leur méiose suite à une stimulation hormonale (Dumont, 1972). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la faible concentration en récepteur à la progestérone présente au niveau de la membrane des ovocytes de stade inférieur. La densité en récepteurs, traduite par la quantité de progestérone radiomarquée se fixant à la membrane, augmenterait fortement aux stades V et VI et dépasserait le seuil limite responsable de la reprise de méiose (Liu and Patiño, 1993).

Deux familles de récepteurs à la progestérone ont été identifiées et contribueraient à la reprise de méiose des ovocytes de xénope :

- xPR : ces récepteurs à la progestérone ont été identifiés grâce à l'utilisation de criblages de séquences communes aux récepteurs humains. La surexpression du récepteur x-PR1 via la micro-injection d'ARNm augmente la sensibilité des ovocytes à la progestérone et accélère la reprise de méiose induite par l'hormone. A l'inverse, suite à la microinjection d'oligonucléotides antisens, le nombre d'ovocytes montrant une GVBD est drastiquement réduit et celle-ci est retardée. Cette inhibition est supprimée par la microinjection de récepteurs purifiés x-PR1 (Tian et al., 2000). Cependant, dans cette étude, le récepteur endogène x-PR/x-PR1 est à peine détectable. De plus la liaison de l'hormone aux récepteurs de l'ovocyte et le turn-over du récepteur lui-même ne sont pas mesurés. Les effets de la surexpression de x-PR/x-PR1 sur la maturation méiotique n'a pas l'impact puissant que l'on pourrait attendre du récepteur endogène. Le protocole expérimental stipule que la maturation ovocytaire a été effectuée sur des ovocytes âgés de plus de 8 jours. Cependant, suite à l'ovariectomie, la capacité à effectuer une reprise de méiose des ovocytes décroit avec le temps. De même l'absence de lésions ovocytaires visibles phénotypiquement ne signifie pas que ceux-ci sont encore physiquement intact (observations personnelles). Des résultats similaires sont observés pour le second récepteur x-PR2. Il est rapporté que ce récepteur semble être majoritairement cytoplasmique puisque seuls 5 à 10% des récepteurs xPR s'associent à la membrane ovocytaire de façon indépendante d'autres structures membranaires (Bayaa et al., 2000). Néanmoins, la surexpression de ces récepteurs pourrait être à l'origine de cette localisation (Wang et al., 2014). La possible présence de deux types de récepteurs dans l'ovocyte, l'un membranaire, l'autre cytosolique, laisse à supposer l'existence de voies différentes pouvant se soustraire l'une à l'autre en fonction des stéroïdes présents et l'idée qu'une communication existe entre ces deux récepteurs est évoquée (Maller, 2003; Jessus and Ozon, 2004).
- xAR : certains travaux ont montré l'existence de récepteurs aux androgènes (AR) au niveau membranaire de l'ovocyte de xénope. Ceux-ci seraient capables de lier la progestérone avec une forte affinité (Evaul et al., 2007). Des études *in vivo* indiquent que la progestérone serait rapidement convertie en androgène *via* l'enzyme CYP17 et que ces androgènes ainsi formés seraient à l'origine de la maturation ovocytaire. Ce phénomène expliquerait le faible taux de progestérone détecté après injection de βhCG (Hormone chorionique gonadotrope humaine) contre une concentration en androgène jusqu'à dix fois supérieure (Lutz et al., 2001). Lorsque CYP17 est bloqué dans les ovocytes, on observe une diminution de la maturation des ovocytes induite par l'hCG preuve de l'importance des androgènes dans ce phénomène (White et al., 2005). L'inhibition de ces récepteurs n'empêche cependant pas la reprise méiotique bien qu'elle diminue, *in vivo*, le pourcentage de maturation stimulée par les androgènes (Lutz et al., 2001; Evaul et al., 2007). À la manière de la progestérone, les androgènes

entrainent la reprise de méiose de façon indépendante de la transcription (White et al., 2005).

Il est finalement vraisemblable que plusieurs récepteurs soient impliqués dans la reprise de méiose de l'ovocyte de xénope. Aux côtés des études qui se heurtent à la difficulté de caractérisation du récepteur à la progestérone, une troisième hypothèse, minoritaire étant donné les nombreuses évidences de son existence, a vu le jour, selon laquelle le récepteur à la progestérone n'existerait pas. Une autre hypothèse indiquerait que l'activation de la maturation serait relayée par des caveolae (Buschiazzo et al., 2011). Ces calveolaes sont des radeaux lipidiques, présents à la membrane des ovocytes. Dans des lignées de cellules germinales de C. *elegans* ces calveolaes sont essentielles pour la progression méiotique (Scheel et al., 1999). Une étude fonctionnelle de la phosphorylation des tyrosines, effectuée sur des ovocytes de Rhinella arenarum, un amphibien de la famille des *Bufonida*, a permis d'émettre l'hypothèse que les récepteurs aux hormones seraient localisés hors des radeaux lipidiques en absence de ligands et, lorsque la progestérone viendrait se fixer, seraient déplacés dans les caveaolaes (Buschiazzo et al., 2011). Cependant de nombreuses choses restent encore à élucider et l'implication des caveaolaes reste très hypothétique.

3.2.1.2. L'insuline et l'IGF1

Certains facteurs de croissance stimulent la reprise méiotique des ovocytes *in vitro*. Les exemples les plus étudiés sont ceux de l'insuline et l'IGF1 (Insulin Growth Factor 1) dont les effets s'exercent selon une cinétique plus lente en comparaison à celle de la progestérone (El-Etr et al., 1979). Cette différence n'est pas encore totalement élucidée, mais on sait que l'insuline et l'IGF1 agissent *via* un récepteur membranaire : l'IGFR (Insuline Growth Factor Receptor), récepteur cloné et étudié dans l'ovocyte de xénope (Hainaut et al., 1991; Janicot et al., 1991; Scavo et al., 1991; Groigno et al., 1996). De plus, la défolliculation des ovocytes diminuerait le pourcentage de maturation des ovocytes stimulée par l'IGF, semblant indiquer la présence de récepteurs dans les cellules folliculaires (Sadler et al., 2010).

3.2.1.3. Expression hétérologue de récepteurs aux facteurs de croissance

La reprise méiotique des ovocytes de xénope peut aussi être entrainée lors de la fixation d'autres facteurs de croissance sur leurs récepteurs respectifs. Il est à noter que ces récepteurs ne sont pas exprimés de manière endogène par l'ovocyte et que leur expression à la surface de la membrane de l'ovocyte est possible grâce à la micro-injection d'ARNm spécifiques. Un certain nombre de facteurs de croissance a été ainsi étudié : le FGF (Fibroblast Growth Factor) (Browaeys-Poly et al., 2000), le hEGFR (Humain Epithelial Growth Factor) (Opresko and Wiley, 1990) ou encore le hNGF (Human Nerve Growth Factor) (Nebreda et al., 1991). Ces études visent principalement à documenter les mécanismes et les acteurs des voies de transduction activées par ces signaux.

Après fixation sur son récepteur, la progestérone entraine une réponse biochimique au sein de l'ovocyte. En résumé : la fixation de la progestérone sur son récepteur entraine (I) la baisse de l'activité PKA (Protéine Kinase A) permettant (II) une augmentation de la synthèse protéique (III) et l'activation du Cdc25 et du MPF (Cdc : Cell Division Cycle).

3.2.2. Les principaux acteurs

La progestérone mobilise deux voies principales : la voie du MPF et la voie MAPK. Ces voies ont fait l'objet d'une attention particulière au cours de notre travail sur la reprise de méiose.

3.2.2.1. Le MPF

Le MPF a été mis en évidence par des expériences de transfert de cytoplasme (Masui and Markert, 1971). Lorsque le cytoplasme d'un ovocyte de *Rana pipiens* préincubé en présence de progestérone est micro-injecté dans un ovocyte immature, on observe une maturation rapide de ce dernier. Cette expérience a mis en évidence un facteur cytoplasmique responsable de la reprise de méiose, appelé MPF pour <u>Maturation Promoting Factor</u>. Par la suite, d'autres études ont mis en évidence l'existence de ce même facteur responsable de l'entrée en mitose (phase M) ou en méiose de cellules eucaryotes. Il a alors été rebaptisé <u>M</u>-phase <u>Promoting Factor</u>.

Le MPF est constitué d'au moins deux sous-unités. Des études sur la levure ont permis l'identification de la première sous-unité, la sous-unité Cdk (Cyclin Dependent Kinase) (Gautier et al., 1988). Le gène cdc2 a été cloné et séquencé et code pour une protéine de 34 kDa (Hindley and Phear, 1984). Ce gène semble conservé entre les espèces puisque de nombreux gènes homologues ont été découverts. L'ensemble de ces protéines présente un poids moléculaire d'environ 33/34 kDa ainsi qu'une séquence conservée de 16 acides aminés formant un motif « PSTAIR ». Le second composant principal du MPF est une protéine de 45 kDa : la cycline B (Gautier et al., 1990). Elles sont au nombre de 4 : les cyclines B1, B2, B4 et B5. Ces cyclines B sont nécessaires à l'activité kinase du MPF et sont responsables non seulement de la spécificité pour les substrats, mais aussi de la localisation intracellulaire du complexe Cdk/Cycline (Booher et al., 1989). Ces cyclines présentent trois domaines essentiels représentés dans la figure 10 :

• La « cycline box » : Région consensus en C-ter constituée d'environ 100 acides aminés impliqués dans la liaison Cdk / Cycline

• La « destruction box » : Séquence en N-ter constituée de 9 résidus requis pour la destruction de la protéine à la transition métaphase/anaphase.



• Le signal de rétention cytoplasmique : permet le maintien de la cycline B dans le cytoplasme au cours de la phase G2 (Pines and Hunter, 1994)

Figure 10 : Représentation schématique de la structure des cyclines B.

Le MPF se compose donc de deux sous-unités principales : une catalytique, la protéine kinase Cdc2 et une régulatrice, la cycline B. D'autres complexes de ce type ont été découverts ensuite donnant naissance à la famille des Cdk (Cyclin dépendent kinases) dont Cdc2 (ou Cdk1), est le chef de file. À l'heure actuelle, il existe 9 Cdks et 11 types de cyclines (A-K) intervenants à différents moments du cycle.

3.2.2.2. La cascade des MAPK

Après fixation du substrat, notamment des facteurs de croissance, les récepteurs membranaires présentent une activité enzymatique de phosphorylation de résidus tyrosine kinase. Le premier substrat de l'activité tyrosine kinase est le récepteur lui-même et l'apparition de tyrosines phosphorylées dans la séquence d'acides aminés du récepteur autorise de nouvelles interactions (1) soit directement avec des kinases (2) soit avec des protéines dites « adaptateurs » (Shc, Grb2, GEF...). La voie RAS/MAPK constitue, avec la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase)/AKT, une des voies de transmission du signal les mieux connues aboutissant à la mise en place de facteurs de transcription. Dans le cadre de la reprise de méiose, c'est la voie MAPK qui nous intéressera particulièrement.

De façon générale, dans les cellules de mammifères, la superfamille des MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinase) est impliquée, dans la survie cellulaire, mais aussi la réponse



apoptotique. Ces MAPKs jouent un rôle dans la régulation du métabolisme intracellulaire et dans l'expression de gènes impliqués dans la croissance, l'apoptose, la réponse au stress et le développement de la cellule.

Figure 11 : Mécanismes de régulation de la voie p38Mos-MEK1-MAPK lors de la reprise méiotique. Au moment de la synthèse protéique p39Mos est synthétisée mais instable. Une fois activée elle va phosphoryler MEK1 qui phosphoryle à son

tour MAPK. Se met un alors en place un rétrocontrôle positif permettant la phosphorylation de p39Mos sur différentes sérines afin de le stabiliser. Des phosphatases PPases régulent négativement la cascade. De plus, le MPF actif stimule la polyadénylation de l'ARNm et phosphoryle son résidu Ser3 afin d'aider à sa stabilisation. (Modifié d'après Beaujois R. 2010)

La cascade des MAPK, activée par des voies de transduction Ras-dépendantes et indépendantes initiées par les récepteurs tyrosines kinases, s'organise en différents niveaux d'activation. Chaque kinase, après activation, active une kinase en aval. Les principaux membres de cette cascade dans les cellules somatiques sont Ras, Raf, MEK (1 et 2) et Erk (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 et 2). D'autres protéines interviennent sur cette cascade pour la réguler positivement ou négativement.

Dans l'ovocyte de xénope, la mise en place de la voie MAPK est essentielle à la reprise de méiose. D'un point de vue fonctionnel, elle s'apparente à la cascade des MAPK observée dans les cellules somatique mais se compose alors de Mos, Mek (MAPKK), Mpk1 (MAPK) et aboutit à l'activation de Rsk. L'ensemble des évènements qui vont être détaillés est résumé dans la figure 11.

Mos

C-mos est le produit du proto-oncogène homologue cellulaire de l'oncogène v-mos du virus responsable du sarcome murin de Moloney. Induite de manière ectopique elle entraine la transformation des cellules en cellules cancéreuses. C'est une serine/thréonine kinase dont la synthèse est spécifique du type cellulaire et restreinte dans le temps. Mos s'exprime, en effet, principalement dans les cellules germinales où elle n'agit que durant la maturation. Cependant, il est à noter qu'elle est aussi exprimée lors de la différenciation de certains tissus tels que le muscle (Pelpel et al., 2000; Lenormand et al., 1997) ainsi que dans certaines tumeurs (Kalejs et al., 2006).

La protéine Mos est absente des ovocytes bloqués en prophase I et n'est synthétisée qu'au cours de la reprise de méiose (Freeman et al., 1989; Sagata et al., 1988). Elle est alors stockée dans les ovocytes matures et est dégradée après la fécondation (Sagata et al., 1988; Watanabe et al., 1991, 1989).

Au cours de la reprise méiotique, l'accumulation de Mos est dépendante de : (1) la synthèse et la stabilisation de la protéine et (2) la stabilisation des ARNm. L'évènement le plus important de la stabilisation de l'ARNm de Mos dans l'ovocyte est sa poly-adénylation. Dans les ovocytes en prophase I, l'absence de queue de polyA sur les ARNm Mos empêche leur traduction ; dans cet état, les ARNm sont dits dormants. La stimulation par la progestérone active les mécanismes de poly-adénylation et donc la traduction de Mos, qui est parmi les premières protéines traduites (Gebauer and Richter, 1997; Sheets et al., 1995). Cette poly-adénylation se fait par le biais de la protéine CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) phosphorylée précocement sur la Ser174 par AuroraA / Eg2 (de Moor and Richter, 1997; Hake and Richter, 1994) permettant le recrutement du CPSF (Clevage and Polyadenylation Specificity Factor) au niveau du signal de poly-adénylation (Mendez et al., 2000).

D'autres travaux suggèrent que l'activation traductionnelle de Mos comprendrait un nouvel élément régulateur : le PRE (Polyadenylation Response Element) localisé dans le 3'UTR (Untraslated Region) de l'ARNm (Charlesworth, 2002). Le CPE (Cytoplasmic

Polyadenylation Element) et le PRE sont tous deux présents en 3'UTR, se chevauchent, mais fonctionnent différemment. La traduction stimulée par la poly-adénylation due au PRE précède celle liée au CPE. De plus, le PRE est la cible des MAPK alors que le CPE est stimulé par Cdk1. Ces observations expliqueraient l'accumulation en deux étapes de la protéine Mos lors de la stimulation à la progestérone (Gotoh et al., 1995). En effet, en présence de progestérone, on observe une stimulation précoce et temporaire de l'activation de traduction de Mos par le PRE *via* la voie MAPK indépendamment de CPEB. Puis, avant la GVBD, l'activation de Cdk1 et la régulation par Aurora 1/Eg2 CPEB permettent une nouvelle accumulation de Mos. Il est à noter que la synthèse de Mos stimulée par PRE n'est pas suffisante pour déclencher la reprise de méiose. Les séquences PRE et CPE pourraient fonctionner séquentiellement pour déclencher et maintenir l'accumulation de la protéine Mos *in vivo* en réponse à la progestérone (Charlesworth et al. 2006).

La protéine Mos synthétisée avant la GVBD peut-être phosphorylée sur quatre sérines : 3 (Nishizawa et al., 1992; Freeman et al., 1992), 16 (Bai et al., 1991), 25 (Yang et al., 1996), 105 (Yue and Ferrell, 2006)) et est instable du fait d'une absence de phosphorylations protectrices (Watanabe et al., 1989; Sagata et al., 1989a). De plus, Mos présente alors une phosphorylation inhibitrice sur la Ser105, dans son domaine kinase, et une structure dépliée (Yue and Ferrell, 2006). Cependant, elle parait suffisante pour activer la cascade des MAPK et entrainer la GVBD (Freeman et al. 1989; Sagata et al. 1989). Pendant et après la GVBD, l'autophosphorylation en Ser3 de Mos permet sa stabilisation dans les ovocytes matures (Watanabe et al., 1989) en empêchant la reconnaissance du résidu Proline 2 adjacent par la machinerie d'ubiquitynilation (Nishizawa et al., 1992, 1993). La phosphorylation en Ser16 pourrait elle aussi protéger Mos de l'ubiquitynilation en agissant sur la même Proline2 (Pham et al., 1999).

La phosphorylation en Ser3 facilite l'association de Mos avec Mek et est la cible d'autophosphorylation (Chen and Cooper, 1995; Nishizawa et al., 1992). Il est à noter que cette phosphorylation est toujours observée en absence d'activité de Mos (Freeman et al., 1992). Cette phosphorylation est due aux MAPK et donc à un feedback positif (Matten et al., 1996).

Les MAPK (Matten et al., 1996), ainsi que le MPF (Liu et al., 1990) sont également capables *in vitro* de phosphoryler le résidu Ser16. Cela empêcherait la dégradation de Mos et donc augmenterait sa stabilité (Pham et al., 1999). Le résidu Ser25 est phosphorylable par la PKA et cet évènement entraine une légère augmentation de l'activité de Mos (Yang et al., 1996). De façon surprenante, la phosphorylation de ce site pourrait inhiber l'activation de Mos induite par la phosphorylation de la Ser3 (Yang et al., 1998; Yue and Ferrell, 2006).

Une voie dépendante du MPF serait capable de réguler négativement la dégradation de Mos. La micro-injection d'une protéine Cdk1 purifiée dont l'activité kinase est déficiente bloque l'accumulation de Mos sans affecter sa synthèse (Nebreda et al., 1995). *In vitro*, Cdk1 phosphoryle et stabilise Mos (Castro et al., 2001).

Mos est à l'origine de l'activation de la voie MAPK lors de la stimulation à la progestérone. La micro-injection d'oligonucleotides antisens de Mos bloque l'activation de Erk2 et de la kinase Rsk (Ribosomal S6 subunit protein kinase) sans altérer la mise en place de la GVBD (Dupré et

al., 2002; Bodart et al., 2005) alors que la micro-injection de Mos déclenche la reprise méiotique. Mos serait donc un élément de reprise de méiose induite par la progestérone des ovocytes sans pour autant être essentiel à celle-ci.

L'implication de Mos dans la morphogenèse du fuseau a été démontrée par l'utilisation d'un morpholino antisense de p39(Mos). Lorsque l'accumulation de p39(Mos) est inhibée, on observe un défaut de phosphorylation de MEK1 et cela même lorsque la reprise de méiose est induite par l'insuline. L'inhibition de l'accumulation de p39(Mos) entraine la formation de structures proche des asters associées aux chromosomes condensés (Bodart et al., 2005).

MAPKK / Mek

Les MAPK kinases (MAPKK) sont des kinases activatrices de kinases. Mos phosphoryle directement la MAPKK Mek1 *in vivo* (Posada et al., 1993). Dans l'ovocyte de xénope, la MAPKK Mek1 active Mpk1 (Erk2) en la phosphorylant sur deux résidus : Thr183 et Tyr185 (Kosako et al., 1993). Les kinases Erk sont les principaux substrats identifiés des Mek. Dans les ovocytes de xénope, une boucle de rétrocontrôle, impliquant la phosphorylation de Jnk (Jun N-terminal protein Kinase) par Mek qui en retour phosphoryle Raf, a été mise en évidence, (Adler et al., 2005). Détectable dans les ovocytes dès le stade I, la quantité de MEK1 augmente ensuite au cours de l'ovogenèse (Furuno et al., 2003).

MAPK / ERK 2 / Mpk1

Mpk1 est l'homologue de la MPK mammalienne Erk2. Il s'agit de la première MAPK découverte, dans les ovocytes de xénope (Haccard et al., 1990), où il n'existe qu'une forme de MAPK/Erk. Activée par phosphorylation par les Mek1 sur les résidus Thr183 et Tyr185, elle compte au moins 160 substrats appartenant à diverses catégories selon leur rôle physiologique : facteurs de transcription, protéines du cytosquelette, kinases et phosphatases, protéines apoptotiques et protéases (Gotoh and Nishida, 1995).

Rsk

La kinase Rsk (Ribosomal S6 subunit protein kinase) est un relais de la voie MEK-ERK. Elle est phosphorylée et activée pendant la reprise méiotique puis déphosphorylée et désactivée après la fécondation (Erikson and Maller, 1989). Il existe deux isoformes de Rsk : Xp90Rsk1 et Xp90Rsk2, toutes deux substrats de Erk2 (Bhatt and Ferrell, 1999). Les Rsk sont considérées comme les relais majeurs des actions cellulaires de la voie Erk2.

3.2.3. Voies de signalisation déclenchées par la progestérone

3.2.3.1. La baisse d'activité PKA

L'arrêt en prophase I des ovocytes de xénope est dû à un taux d'AMPc élevé et à la présence d'une activité PKA. Lors de la reprise méiotique, l'inhibition de l'adénylate cyclase membranaire est responsable de la diminution du taux d'AMPc dans les ovocytes de xénope (Finidori-Lepicard et al., 1981; Sadler and Maller, 1981) et la baisse d'activité PKA (Wang and Liu, 2004).

Cette réponse biochimique observée dans des ovocytes traités à la progestérone implique un récepteur couplé à une protéine G. En effet, la synthèse de l'AMPc est catalysée par cette enzyme membranaire, qui est sous le contrôle de protéines G complexes hétérodimériques ($\alpha\beta\gamma$)activées par leurs liaisons au GTP. La progestérone entraine une inhibition de 50% de l'adénylate cyclase (Sadler and Maller, 1981) et une baisse de la concentration d'AMPc (20%) (Maller et al., 1979; Wang and Liu, 2004), dégradé par la phosphodiestérase. La chute du taux d'AMPc joue un rôle important dans la maturation. En effet, des inhibiteurs de la phosphodiestérase comme la théophylline ou la papavérine (O'Connor and Smith, 1976; Bravo et al., 1978) bloquent la maturation.

Figure 12 : Activation de la PKA. La PKA est formée par une holoenzyme, constituée par deux sous-unités catalytiques (C) et deux sous unités régulatrices (R). La sous-unité C contient le centre actif alors que la sous-unité de R dispose de deux sites de liaison de l'AMPc. Ce complexe de sous-unités C et R est à l'état inactif. La liaison de l'AMPc à la sous-unité R induit l'activation de la sous-unité C accompagnée par la dissociation des sous-unités R de la sous-unité C.

Les PKA sont des tétramères formés de deux chaines régulatrices (R) et de deux chaines catalytiques (C) (Figure 12). Sous forme tétramérique, la PKA n'a pas d'activité enzymatique. La fixation de l'AMPc sur les chaines régulatrices entraine la libération des chaines catalytiques permettant ainsi la phosphorylation des protéines cibles de PKA. La baisse de la concentration en AMPc observée dans les ovocytes traités à la progestérone se traduit par une baisse de l'activité de la PKA (Wang and Liu, 2004). Cette baisse d'activité semble être indispensable à la maturation. En effet, dans les ovocytes, la micro-injection de la sous-unité catalytique active de la PKA bloque la maturation. *A contrario*, la micro-injection d'inhibiteur de la PKA entraine la maturation en absence de progestérone (Maller and Krebs, 1977). Cependant, l'injection d'une sous-unité catalytique inactive de PKA inhibe également la maturation ce qui suggère que la PKA n'exercerait pas son activité inhibitrice de la maturation *via* la phosphorylation des protéines cibles, mais par une activité de séquestration de ces protéines (Schmitt and Nebreda, 2002). Mais cette possibilité a par la suite été exclue par l'utilisation d'une PKA non fonctionnelle dépourvue d'activité kinase incapable d'inhiber la maturation (Eyers et al., 2005).

3.2.3.2. Synthèse protéique : C-mos / Cyclines B

La baisse d'activité PKA va entrainer une reprise de la synthèse protéique. Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas complètement élucidés. Un petit nombre de protéines est synthétisé durant la période précédant la GVBD et la synthèse protéique augmente significativement durant la maturation (Baltus et al., 1973). Si l'activation du MPF apparait en absence de toute transcription (Schorderet-Slatkine and Drury, 1973) les inhibiteurs de la traduction, telle que la cycloheximide, empêchent cette activation, preuve qu'il y a nécessité de production d'au moins une protéine initiatrice (Wasserman and Masui, 1975).

Mos

Mos est la protéine à l'origine de l'activation de la cascade de phosphorylation des MAPK dans les ovocytes de Xénope. Cette fonction semble avoir été conservée au cours de l'évolution (Amiel et al., 2009).

La micro-injection d'oligonucleotides antisens de c-mos entraine le blocage de la maturation induite par la progestérone en bloquant la GVBD (Sagata et al., 1988). Au contraire, l'injection de l'ARNm de c-mos induit la maturation des ovocytes en absence de progestérone (Sagata et al., 1989a; Freeman et al., 1989). De même, l'injection d'une protéine de fusion MBP-mos est

capable d'induire la maturation (Sagata et al., 1989a). L'injection de cette même protéine de fusion dans un milieu contenant de la cycloheximide, un antifongique qui bloque la synthèse protéique, a démontré que l'implication et la synthèse d'autres protéines semblent requises afin de compléter la seconde division de méiose (Yew et al., 1992).

D'autres études utilisant l'approche morpholino ont apporté de nouvelles données. Les morpholinos sont utilisés en tant qu'outils pour la génétique inverse par inactivation de la fonction d'un gène. Ceci est accompli en empêchant les cellules de synthétiser une protéine ciblée ou en modifiant l'épissage d'un pré-ARNm. Les morpholinos antisens, plus spécifiques et plus affins que les ARN antisens, se lient sur l'ARNm cible, au niveau du codon d'initiation, et bloquent sa traduction. L'ARNm reste donc présent et intact dans la cellule, contrairement à l'utilisation d'oligonucléotides antisens, qui entraine la dégradation de l'ARNm d'intérêt par la RNAse H. De manière surprenante, dans un ovocyte en prophase I, aucun blocage de la maturation induite par la progestérone n'est observé suite à l'injection d'un morpholino anti Mos. Ces résultats soulignent le fait que la synthèse de la protéine n'est pas requise. De plus, la cascade des MAPK et le MPF sont activées normalement (Dupré et al., 2002).

Mos ne serait donc pas la seule protéine dont la synthèse serait requise pour la maturation. Elle ne contrôlerait pas non plus l'activation du MPF puisque d'autres résultats appuient le fait que Mos n'est pas la protéine dont la synthèse est strictement requise pour l'activation de Cdc2. En effet, l'accumulation de Mos induite par la progestérone est inhibée par l'injection d'une forme dominante négative de Cdc2, de la protéine p21Cip1 ou d'anticorps bloquant Cdc2, situant la synthèse de Mos en aval de l'activation de Cdc2 et pointe la cycline B1 comme importante dans les évènements précoces de la maturation (Nebreda et al., 1995; Frank-Vaillant et al., 1999).

Par la suite, il a été démontré que la phosphorylation de Mos par Cdc2 est requise pour sa stabilisation en GVBD (Nishizawa et al., 1992; Castro et al., 2001). Ainsi, non seulement Mos ne serait pas nécessaire à l'activation du MPF au moment de GVBD, mais sa synthèse et/ou sa stabilité serait même en partie sous le contrôle du MPF.

Cyclines

L'ovocyte de xénope présente quatre types de cyclines B intervenants dans la maturation : les cyclines B1, B2, B4 et B5 (Tableau 2). En prophase, 10 à 20% de la protéine Cdc2 est associé aux cyclines B2/B5 (Kobayashi et al., 1991; Hochegger et al., 2001). La Cdc2 liée est phosphorylée sur les Thréonines 161 et 14 et la Tyrosine 15 formant ainsi un stock inactif de MPF nommé pré-MPF. Le reste de Cdc2 libre est inactif et peut déjà être phosphorylé sur la Thréonine 161. Il peut alors s'associer à la cycline ou d'autres partenaires (De Smedt et al., 2002). Il semble que la synthèse de la cycline, s'associant au Cdc2 libre pour former du MPF actif, serait nécessaire et important pour la reprise de méiose. Cette idée est supportée par des observations en modèles embryonnaires et acellulaires (extraits fractionnés) où la synthèse de cycline s'est révélée primordiale dans le cadre de la mitose (Murray et al., 1989). Dans l'ovocyte de xénope la reprise de méiose peut être obtenue par micro-injection de cycline ou de son ARNm (Swenson et al., 1986). De même, l'utilisation d'oligonucléotides antisens des cyclines A, B1, B2 n'empêche pas la maturation d'ovocytes en présence de progestérone (Minshull et al., 1991). L'ensemble de ces données prouve que la synthèse des cyclines est suffisante, mais non nécessaire à l'activation initiale du MPF (Hochegger et al., 2001).

Tableau 2 : Accumulation des différentes Cyclines B dans l'ovocyte de xénope. Les lettres entre parenthèses représentent les homologies de séquence entre les différentes cyclines. Les cyclines ne sont pas synthétisées au même moment du cycle. Les cyclines B2 et B5 sont synthétisées durant l'ovogenèse afin de former le pré-MPF alors que les cyclines B1 et B4 s'accumulent après l'activation du MPF (ligne hachurée). Aucune donnée n'est à ce jour recensée pour la cycline B3.

Cycline		Ovogenèse	Méiose		
			1 ^{ere} division		2 ^{eme} division
B1	(a)				
B2	(b)				
B3	(c)	N.D.		N	.D
B4	(a)				
B5	(b)				

Il apparait donc qu'aucune de ces protéines synthétisées ne serait réellement requise pour la reprise de méiose induite par la progestérone. Cependant, l'inhibition conjuguée de la synthèse des Cyclines et de Mos par des antisens est capable de bloquer la reprise de méiose déclenchée par la progestérone (Haccard and Jessus, 2006). Ces deux voies seraient donc redondantes. Si l'une de ces voies est inactivée, l'autre prend alors le relais. C'est donc l'action conjuguée de ces deux protéines qui serait responsable de l'activation optimale du MPF lors de la reprise de méiose.

3.2.3.3. Activation initiale du MPF

Cdc2 se trouve sous deux formes dans l'ovocyte : 10/20 % forme le pré-MPF, MPF inactif car phosphorylé sur les résidus Thr14 et Tyr15. Le reste du Cdc2 est monomérique et parfois phosphorylé en Thréonine 161, en attendant une liaison avec une cycline pour devenir actif. L'identité des protéines responsables de ces différentes phosphorylations sera précisée plus loin. Il existe donc deux façons d'obtenir du MPF actif : par déphosphorylation du pré-MPF ou par association du Cdc2 monomérique et phosphorylé avec une cycline.

Activation par néo-synthèse de cyclines

Suite à un stimulus hormonal, les cyclines B1 et B4 sont fortement synthétisées. Ces cyclines s'accumulent juste avant la GVBD (Kobayashi et al., 1991; Hochegger et al., 2001). La synthèse de la cycline B1 est dépendante de la chute de l'activité PKA, mais indépendante de l'activation initiale de Cdc2 puisqu'elle peut avoir lieu même en présence de p21^{cip1}, un inhibiteur de cdc2 (Frank-Vaillant et al., 1999). Ainsi, la progestérone serait à l'origine de la production de cycline B1 et B4 qui, en s'associant à des protéines Cdc2 déjà phosphorylées en Thr161, serait à l'origine de la formation de complexe de MPF actifs induisant l'activation du stock de pré-MPF. Cependant, l'injection d'oligonucléotide antisens dirigés contre l'ensemble des ARNm des Cyclines B1 à 5 ne bloque pas l'activation du MPF (Minshull et al., 1991; Hochegger et al., 2001; Haccard and Jessus, 2006). Ainsi la néosynthèse de cycline est suffisante mais non nécessaire à l'activation initiale du MPF. Il n'est pas exclu qu'une autre cycline, que la cycline B, puisse être capable de se fixer au Cdc2 monomérique.

3.2.3.4. Boucle d'auto-amplification du MPF

L'existence d'une boucle d'auto-amplification du MPF a été mise en évidence par des expériences de transfert de cytoplasme dans les ovocytes de *Rana Pipiens* (Masui and Markert, 1971). Ces expériences consistent à micro-injecter dans des ovocytes en prophase I du cytoplasme d'ovocytes matures bloqués en métaphase II. Ces micro-injections entrainent alors une reprise de méiose de l'ovocyte micro-injecté et cela même en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (Wasserman and Masui, 1975).

Il existe dans l'ovocyte une petite quantité de pré-MPF –MPF inactif- mettant une route un processus d'auto-amplification. Le MPF est, en effet, capable d'une amplification autocatalytique (Masui and Markert, 1971). De même, il existe un rétrocontrôle positif entre Cdc2 et Cdc25 (Hoffmann et al., 1993; Izumi and Maller, 1993; Strausfeld et al., 1994). L'amorce de MPF actif est capable de phosphoryler les sites activateurs de Cdc25 de manière directe (Izumi et al., 1992). Mais, si cette phosphorylation est nécessaire à la boucle d'auto-amplification du MPF, elle n'est pas suffisante (Karaïskou et al., 1998). D'autres protéines sont donc impliquées dans cette boucle.

Le rôle de la protéine Plx1 (Polo Kinase 1 *xenopus*) dans la boucle d'auto-amplification du MPF a été montré en utilisant des ovocytes de stade IV, non compétents à la reprise de méiose. Dans ces ovocytes, la protéine Plx1 est absente et sa surexpression est capable de restaurer la boucle d'auto-amplification (Karaiskou et al., 2004). Mais l'activation de Plx1 étant sous le contrôle de Cdc2, la boucle doit être lancée par une amorce de MPF actif. Ainsi Plx1 travaille de concert avec Cdc2 pour activer Cdc25 par phosphorylation.

En retour, Cdc25 déphosphoryle le stock de pré-MPF sur les résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 et l'active. Par conséquent, plus Plx1 et Cdc25 sont actifs, plus les molécules de MPF sont activées.

3.2.4. Régulation des différents acteurs

Ainsi la fixation de la progestérone sur son récepteur entraine une cascade de réactions aboutissant à la synthèse et l'activation du MPF et de la voie MAPK via une baisse d'activité PKA et une synthèse protéique. Cependant d'autres protéines interviennent dans la régulation du MPF, de la boucle d'auto-amplification et de la cascade des MAPK.

3.2.4.1. Les régulations du MPF

Régulation de la cycline

Dans les extraits d'œufs de xénope, un modèle d'étude de la mitose, les niveaux de cycline B évoluent de manière cyclique (Murray and Kirschner, 1989; Evans et al., 1983) (Figure 13). Sa concentration et sa localisation varient au cours du cycle. En mitose, en phases S et G2, on observe une accumulation de la protéine qui s'associe à Cdc2, ce complexe se localise alors dans le cytoplasme. Dès l'interphase, dans les cellules somatiques, la quantité augmente et avant la mitose la protéine subit une translocation vers le noyau (Li et al., 1997). Des expériences, portant sur des ovocytes, ont démontré que l'activation du MPF, serait cytoplasmique et pourrait se faire en absence du noyau (Pérez-Mongiovi et al., 2000; Picard et al., 1991). La question de la nécessité de cette translocation pour l'entrée en phase M s'est alors posée (Li et al., 1997). La relocalisation nucléaire serait importante, dans les cellules somatiques, dans la mesure où la phosphorylation de substrats nucléaires par le MPF est essentielle pour les

premières étapes de la mitose. Le début de la mitose est d'ailleurs caractérisé par la phosphorylation de la Cycline sur le signal CRS (Cytoplasmic Retention Signal) (Pines and Hunter, 1991) qui contient également la séquence NES (Nuclear Export Signal), ce qui a pour conséquence d'inhiber l'export du complexe Cdc2/Cycline B hors du noyau (Yang et al., 1998). Au cours de la reprise de méiose, lors de la transition prophase I/métaphase II, une augmentation de la concentration en cycline est elle aussi observée (Hochegger et al., 2001).



Figure 13 : Concentration en MPF et cycline B dans des extraits cyclants d'œuf de xénope.

Le motif « PSTAIRE » est exposé à la surface de la protéine comme le démontre une étude cristallographique de Cdk2 (De Bondt et al., 1993). Si cette région est mutée, aucune fixation à la cycline n'est possible. De même, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre cette région permet l'immunoprécipitation de la Cdk sous forme monomérique (Pines and Hunter, 1990). Cependant, la liaison seule de la cycline ne suffit pas à l'activation du complexe qui nécessite un changement de l'état de phosphorylation de Cdk1. Ainsi, deux évènements sont indispensables à la reprise de méiose : (1) la fixation de la cycline et la formation du complexe Cdk/cycline ainsi que (2) le changement d'état de phosphorylation de la Cdk.

Régulation de Cdc2 (Cdk1) par phosphorylation :

Ce complexe Cdk/Cycline est régulé par trois sites majeurs de phosphorylation sur Cdc2 : Thr161, Tyr15 et Thr14. La phosphorylation sur le résidu Thr161 est indispensable pour l'activité de cdc2 et est cruciale pour l'association cycline B/cdc2. La majorité du Cdc2 est présente sous la forme monomérique dans le compartiment cytoplasmique. Seul 10% est retrouvé associé à la cycline B2 et B5 pour former le pré-MPF. Ce Cdc2 monomérique est phosphorylé sur la thréonine 161. Cette phosphorylation pourrait être due à la présence d'une CAK (Cdk Activating Kinase) capable de phosphorylée Cdc2 sous sa forme monomérique. Une telle enzyme, nommée CAK1 ou Civ1, a été identifiée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Thuret et al., 1996; Kaldis et al., 1996; Espinoza et al., 1996). Cependant aucune CAK de ce genre n'a pour le moment été identifiée dans l'ovocyte de xénope. Cette Cdc2 phosphorylée sur le résidu Thr161, phosphorylation indispensable à la liaison avec la cycline, serait déphosphorylée par PP2C, permettant la présence de deux types de Cdc2 monomérique dans la cellule : (1) Cdc2 phosphorylée en Thr161, pouvant être activée par la cycline et (2) Cdc2 non phosphorylée, non activée (De Smedt et al., 2002).

Les phosphorylations inhibitrices qui ont lieu sur les résidus Tyr15 et Thr14 permettent l'accumulation d'une forme inactive du MPF : le pré-MPF. La protéine Myt1 est une protéine membranaire à activité kinase permettant la phosphorylation des résidus Tyr15 et Thr14 du MPF. La déphosphorylation par Cdc25c de Thr14 et Tyr15 entraine la libération de la poche d'interaction avec l'ATP, ce qui active la kinase, celle-ci pouvant alors phosphoryler ses nombreux substrats. Dans le cadre des cellules somatiques, ces substrats sont impliqués dans de nombreux processus de la vie cellulaire, tels que la signalisation, le métabolisme, la réplication de l'ADN et la transcription. L'activation du MPF constitue l'évènement moléculaire majeur de la reprise de méiose, qui permet la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes et la formation du fuseau de division.

De nombreuses protéines interviennent pour réguler la phosphorylation/déphosphorylation de Cdc2. La figure 14 résume les informations qui vont suivre sur ces protéines.

Figure 14 : Mécanisme de régulation du MPF par phosphorylation et déphosphorylation. Le MPF existe sous forme inactive nommée pré-MPF présentant des phosphorylations inhibitrices en Thr14 et Tyr15. Ces phosphorylations sont dues aux protéines Wee1 et Myt1. Le complexe Cdc 2/Cycline B triphosphorylé forme le pré-MPF. La kinase Wee1, absente dans le modèle ovocytaire, est spécifique de la division mitotique. Lors de la reprise méiotique, la stimulation des ovocytes par la progestérone provoque, par phosphorylation, l'inactivation de Myt1 et l'activation de la phosphatase Cdc25c. Celle-ci permettra l'activation du pré-MPF en déphosphorylation les résidus inhibiteurs. (Modifié d'après Beaujois R. 2010)





Mis en évidence chez la levure *S. pombe*, Wee 1 a ensuite été cloné dans de nombreux organismes (levure, drosophile, xénope, souris, Homme). Certains de ces organismes présentent deux formes de la protéine très proches l'une de l'autre : Wee1A et Wee1B (Russell and Nurse, 1987; Igarashi et al., 1991; Mueller et al., 1995). Wee1, cytoplasmique, phosphoryle cdc2 en Tyr15 (Mueller et al., 1995) ainsi qu'en Thr14 (Den Haese et al., 1995) dans le contexte mitotique. Ces phosphorylations n'interagissent pas avec la liaison de l'ATP à la protéine, mais empêchent le substrat d'accéder au site catalytique de la kinase rendant la Cdk inactive.

L'activité de ces deux protéines inhibitrices est régulée *via* une hyperphosphorylation inhibitrice lors de l'entrée en phase M (Harvey and Kellogg, 2003; Harvey et al., 2005).

Cdc2 régulerait Wee1 : *in vitro* Cdc2 peut, en effet, lier et phosphoryler cette protéine (Tang et al., 1993; Mueller et al., 1995). Il existerait donc une boucle d'activation où Cdc2 hyperphosphorylerait et inactiverait wee1, permettant une activation plus forte et plus rapide du MPF afin d'entrer en mitose. Cette hypothèse est validée chez la levure où en début de mitose le complexe Clb2/Cdc28 (homologue de Cdc2/Cycline B) lie et phosphoryle Wee1 *in vitro* et *in vivo* entrainant son inhibition (Harvey et al., 2005). Cependant en mitose, Wee1 ne serait pas phosphorylé uniquement par Cdc2 puisque dans des extraits cyclants de xénope sans Cdc2, une autre protéine entraine sa phosphorylation (Mueller et al., 1995). Il est à noter que Wee1 est absent des ovocytes immatures de xénope, et ne commence à s'accumuler que lors de la deuxième division de méiose.

Dans l'ovocyte de xénope, la protéine responsable des phosphorylations inhibitrices de Cdc2 est la protéine Myt1. Elle présente dès le stade I ovocytaire et s'accumule jusqu'au stade IV (Furuno et al., 2003). En début de mitose, lors de la transition G2/M, dans une étude portant sur la levure *S. Pombe* et une lignée d'ostéosarcomes humains, Myt1 a été décrite comme interagissant avec le complexe Cdc2/Cycline B *via* son domaine C-ter et le séquestrerait ainsi dans le cytoplasme (Wells et al., 1999). Dans le cadre de la méiose, l'injection d'anticorps anti-Myt1 est capable d'entrainer la reprise de méiose suggérant que l'inactivation de Myt1 est essentielle pour la levée du blocage en prophase I des ovocytes de xénope (Nakajo et al., 2000). L'inactivation de Myt1 est le fruit de la phosphorylation de la protéine par la kinase p90Rsk dans son domaine régulateur en région C-ter (Palmer et al., 1998) ainsi que par p39Mos (Peter et al., 2002). Myt1 est aussi capable de s'autophosphoryler sur les sérines 66 et 76 participant ainsi à l'inhibition de la kinase lors de la transition G2/M (Kristjánsdóttir et al., 2006). En 2011, il a été montré que lors de la reprise de méiose, Myt1 était inactivée par phosphorylation par les néo-complexes de MPF synthétisés suite à la stimulation hormonale (Gaffré et al., 2011).

PP1 ou PP2A (Protein Phosphatase A et 2A), deux phosphatases, seraient elles aussi capables d'inhiber le MPF puisque l'acide okadaique (inhibiteur de PP1, PP2A) provoque l'autoamplification du MPF (Karaïskou et al., 1998; Izumi et al., 1992; Karaïskou et al., 1999). PP1 et PP2A sont capables d'altérer la progression mitotique. Elles existent rarement sous forme libre et sont majoritairement liées à des substrats ou des sous-unités régulatrices.

Des études ont démontré que seule PP2A inhibait la reprise de méiose. En effet, la déplétion de PP2A dans des extraits cyclants de xénope, un modèle de mitose, entraine l'activation de Cdc2 alors que la modulation du niveau d'activité de PP1 n'affecte en rien Cdc2. La phosphatase PP2A serait donc un inhibiteur majeur de l'activation de Cdc2 (Maton et al., 2005). Dans cette famille d'enzymes, les sous-unités catalytiques (C) et structurales (A) sont liées de façon constitutive. L'hétérodimère AC qui est aussi appelé le « core » est capable de s'associer à diverses sous-unités régulatrices de type B (B) et de former une enzyme fonctionnelle. Dans le cadre de la méiose, PP2A s'associe à B558, sous unité-régulatrice, et la concentration du complexe varie au cours du cycle : on en retrouve beaucoup en interphase et peu en mitose. Si le niveau de concentration du complexe est maintenu bas dès l'interphase et tout au long du

cycle, on observe une accélération de l'entrée en mitose des extraits cyclants et un maintien de celle-ci. Si la déplétion a lieu durant la mitose, la sortie de mitose est retardée, indiquant que PP2A intervient aussi dans les mécanismes permettant la sortie de mitose. L'augmentation de la concentration du complexe PP2A-B558 par ajout d'enzymes recombinantes inhibe l'entrée en mitose (Mochida et al., 2009). PP2A serait en réalité responsable de la déphosphorylation de Cdc25c sur la Ser287, ce qui a été démontré dans des extraits d'œufs de xénope (Hutchins et al., 2002; Margolis et al., 2003).

Dans l'ovocyte de xénope Myt1 et le complexe PP2A-B558 sont responsables de l'inhibition du MPF dans l'ovocyte de xénope. Le premier est à l'origine des phosphorylations inhibitrices de Cdc2 alors que le second empêche l'activation de Cdc25c, phosphatase activatrice du MPF.

Activateurs

Cdc25 est la phosphatase activatrice de Cdc2 par déphosphorylation des résidus Thr14 / Tyr15 (Kumagai and Dunphy, 1991; Gautier et al., 1991; Strausfeld et al., 1991). Il existe 3 types de Cdc25 : Cdc25A / Cdc25B / Cdc25c. Les Cdc25A et B sont spécifiques de la transition G1/S tandis que la phosphatase Cdc25c intervient lors de la transition G2/M. Cependant, les phénotypes de souris mutantes suggèrent une redondance fonctionnelle entre ces protéines en cas de déficience : en absence de Cdc25 B et C, la phosphatase Cdc25 A permet seule la progression d'une cellule au travers du cycle cellulaire (Ferguson et al., 2005).

La micro-injection de la protéine Cdc25c dans l'ovocyte active une petite quantité de pré-MPF endogène (jusque-là inactif) suffisante pour enclencher le processus d'auto-amplification du MPF et donc la reprise méiotique jusqu'en métaphase II (Gautier et al., 1991; Lee et al., 1992; Izumi et al., 1992). Chez le xénope la boucle d'auto-amplification du MPF s'effectue en absence de toute synthèse protéique (Wasserman and Masui, 1975). Cette boucle d'auto-amplification repose sur l'existence d'un stock de Cycline B2 et B5 dans les ovocytes immatures sous forme associé à Cdc2 inactif car phosphorylé par Myt1 (Hochegger et al., 2001). Il existe un rétrocontrôle positif entre cdc2 et cdc25 (Hoffmann et al., 1993; Izumi and Maller, 1993; Strausfeld et al., 1994).

Cdc25 est actif sous forme phosphorylée. Cette phosphorylation est catalysée par le MPF et par d'autres protéines telles que Plk1 (ou Plx1 chez le xénope) (Karaïskou et al., 1998; Izumi et al., 1992). Chez le xénope, il a été montré *in vitro* que Plx1 se lie à l'extrémité N-terminale régulatrice et phosphoryle Cdc25c sur un motif consensus D/E-X-S/T entrainant son activation (Kumagai and Dunphy, 1996). Sa déplétion dans des extraits de xénope supprime l'hyperphosphorylation activatrice de Cdc25c (Karaïskou et al., 1998, 1999). Chez l'Homme, Plk1 est activée simultanément au MPF. Plk1 régule Cdc25c en le phosphorylant sur la Ser198 présente dans la séquence NLS (Nuclear Localization Signal) située en N-Terminal, ce qui permettrait le transport de Cdc25c dans le noyau en début de prophase, lorsque l'enveloppe nucléaire est encore intacte permettant la colocalisation nucléaire du MPF et de son activateur. (Toyoshima-Morimoto, 2002). Plx1 entrainerait donc la phosphorylation de Cdc25c dans le xénope, permettant sa localisation dans le noyau et son activatrice du MPF par déphosphorylation.

Cependant, dans des extraits cyclants de xénope Cdc25c est localisé dans le cytoplasme en interphase, à cause de la séquestration induite par la protéine 14-3-3, qui est facilitée par une

phosphorylation sur une Sérine 287 (Ser216 chez l'Homme) (Kumagai et al., 1998; Kumagai and Dunphy, 1999). Cette protéine de séquestration jouerait un rôle essentiel dans la transition G2/M en inhibant Cdc25 et en assurant sa localisation cytoplasmique. L'inhibition de PP1 empêche l'entrée en phase M. Chez le xénope, la Ser/Thr phosphatase PP1 serait responsable de la déphosphorylation de Cdc25c en Ser287 (Ser216 chez l'Humain) et donc de sa dissociation avec 14-3-3, ce qui permet son activation et son importation dans le noyau afin d'y activer le MPF (Kumagai and Dunphy, 1999). Des études *in vivo* ont démontré que xCdc25c est associé à la protéine 14-3-3 dans les ovocytes de xénope, et que ce complexe se dissocie durant la reprise méiotique. Dans cette même étude l'auteur conclut que l'inhibition induite par 14-3-3 est bien liée à une exclusion du noyau de Cdc25c, empêchant sa colocalisation avec le MPF (Yang et al., 1999). La liaison à la protéine 14-3-3 protège Cdc25c d'une déphosphorylation prématurée. En effet, la déphosphorylation en Ser287 n'a lieu qu'après dissociation du complexe avec 14-3-3. Ce modèle reste hypothétique.

Pour activer Cdc25c et permettre son action sur le MPF, il faut donc (1) empêcher sa séquestration par la protéine 14-3-3 en déphosphorylant un résidu Ser287, et (2) entrainer sa phosphorylation par Plx1 dans la séquence NLS, l'ensemble de ces phénomènes permettant sa colocalisation nucléaire avec le MPF.

La calmoduline kinase II (CaMKII) ainsi que les kinases Chk1 et ChK2 (Checkpoint Kinase 1 et 2) impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire et notamment la réponse aux dommages à l'ADN, sont capables de phosphoryler Cdc25c sur le résidu Ser287 (Kumagai et al., 1998; Guo and Dunphy, 2000; Hutchins et al., 2003). Cependant, l'immuno-déplétion de Chk1 et Chk2 n'inhibe qu'à 30% cette phosphorylation, suggérant l'intervention d'une autre kinase majoritairement responsable de la phosphorylation (Nakajo et al., 1999; Guo and Dunphy, 2000). Xp38 γ /SAPK43, une protéine de la famille des MAPK, participe également à l'activation de Cdc25c par phosphorylation du résidu sérine 205 (Perdiguero et al., 2003).

Très récemment, la kinase Greatwall (Gwl) a été identifiée. Initialement découverte chez la drosophile en 2004, Gwl a tout d'abord été proposée comme ayant un rôle dans la progression mitotique et la condensation des chromosomes, rôles confirmés par des études portant sur le même modèle (Hara et al., 2012; Bettencourt-Dias et al., 2004). Mais c'est dans l'ovocyte de xénope que la caractérisation de ses fonctions dans le cycle cellulaire a été précisée. La déplétion de Gwl dans des extraits mitotiques d'ovocyte de xénope est à l'origine d'une sortie de mitose. Cette sortie est concomitante avec l'inactivation du complexe MPF, due à la phosphorylation du résidu Tyr15 de Cdc2. Si l'inhibition de Gwl a lieu dans des extraits cyclants, l'activation du MPF ne peut avoir lieu et aucune entrée en mitose n'est observée indiquant un rôle probable de Gwl dans la régulation de l'activation du MPF (Yu et al., 2006). Greatwall est parfois considérée comme étant un nouveau membre du complexe MPF avec la cycline B et Cdc2 (Hara et al., 2012). ARP19, une protéine inhibitrice des phosphatases, spécifique de PP2A, est phosphorylée par Gwl en S67, permettant sa fixation sur le complexe PP2A-B558 et l'inhibition de l'activité de PP2A. Ce processus est contrôlé par Cdc2. Lorsque ARP19 est phosphorylée par Gwl, elle échappe au contrôle de la PKA et permet l'activation du MPF de façon indépendante de la synthèse protéique grâce à une petite réserve de Mos déjà présente (Dupré et al., 2014).



Figure 15 : Mécanismes de régulation de Cdc25c lors de la reprise méiotique des ovocytes de xénope. Cdc25c est maintenue inactive dans les ovocytes de xénope par le biais d'une phosphorylation en S287 provoquant sa séquestration cytoplasmique par la protéine 14-3-3. La PKA, mais aussi la CaMKII et les protéines Chk, sont à l'origine de cette phosphorylation. L'inhibition de PKA permet la déphosphorylation de Cdc25c par PP1. De plus, la phosphorylation par CdK2 de la T138 permet la libération de Cdc25c. La phosphorylation de Cdc25c par Xp38 γ (S205) et Plx1 (*via* xPlkk1) active la protéine. Enfin, Greatwall, par son activité de phosphorylation de ARP19, permet l'inhibition de PP2A, un inhibiteur de Cdc25c. (Modifié d'après Beaujois R. 2010)

Ringo/Speedy (Rapid Inducer of G2/M progression) est une protéine non apparentée à une cycline, mais capable de se lier à Cdc2 et de l'activer (Ferby et al., 1999; Lenormand et al., 1999). La protéine speedy du xénope (xSpy) a été à l'origine identifiée lors d'un screen de gènes conférant une résistance aux UV d'une souche déficiente pour Rad1 de S. Pombe. Cette protéine est capable d'induire une maturation rapide montrant une GVBD et une activation du MPF. Spy1 active la voie MAPK et sa capacité à induire la maturation est dépendante de cette cascade de phosphorylations (Lenormand et al., 1999). XRINGO a été identifiée lors d'un screen visant à déterminer des gènes impliqués dans la transition G2/M de l'ovocyte de xénope. L'expression de XRINGO en prophase I provoque une reprise de méiose plus rapide que celle produite par la progestérone ou par l'expression de Mos. La déplétion du XRINGO endogène entraine un retard de maturation induite par la progestérone (Ferby et al., 1999). La liaison à la CDK est due à la présence d'une région centrale nommée Speedy/Ringo box. La mutagenèse ou la déplétion de résidus conservés de la box entre les espèces entraine une baisse de la capacité à lier les CDK et à induire la GVBD, indiquant que cette région serait nécessaire à l'activation de la Cdc2 (Cheng et al., 2005b; Dinarina et al., 2005). Elle est présente dès la prophase (Gutierrez et al., 2006). La micro-injection de Ringo/Speedy serait capable d'engendrer la reprise de méiose en absence de toute stimulation hormonale. De même, des oligonucléotides antisens dirigés contre ses ARNm retardent la maturation induite par la progestérone, mais ne l'inhibe pas (Lenormand et al., 1999). Il a été de plus prouver que son partenaire préférentiel serait Cdk2 et non Cdk1 (Karaiskou et al., 2001). Cependant, il a été suggéré que Ringo/Speedy jouerait un rôle lors de la transition métaphase I – métaphase II plutôt que dans les étapes précoces de la maturation méiotique remettant en cause son implication dans la reprise de méiose (Gutierrez et al., 2006)

Chez l'homme et dans le cadre de la mitose, le complexe Spy1/CDK2 est capable de phosphoryler les membres de la famille Cdc25 (Cheng et al., 2005a). Il pourrait participer à une boucle de feedback positif qui permet l'activation continue de Cdc2. L'on ne sait cependant pas encore si les Cdc25 phosphorylées par Spy1/Cdk2 sont capables d'activer uniquement ces derniers complexes ou si elles sont capables d'activer aussi les complexes CDK/Cycline.

L'ensemble de ces informations est résumé dans la figure 15.

Le MPF est donc majoritairement régulé par une balance entre la synthèse et la dégradation de la cycline ainsi que par de nombreuses protéines, et de leurs régulateurs respectifs, responsables de la phosphorylation et la déphosphorylation de la Cdk.

3.2.4.2. MAPKs phosphatases

Les MAPK présentent dans leur boucle d'activation des résidus thréonines et/ou tyrosines responsables de leur inactivation lorsque déphosphorylés par les MAPK phosphatases (MKP). Une dizaine de MKP ont été identifiées : celles-ci sont divisées en trois groupes, selon leur spécificité de déphosphorylation. Certaines sont capables de déphosphoryler un seul des deux résidus alors que les phosphatases doubles spécificités (DUSP ou DSP) sont capables d'agir sur les deux résidus à la fois.

Toutes les MKP présentent des similarités structurelles :

- Un domaine PTP c-terminal, domaine catalytique tyrosine phosphatase
- Un domaine KIM permettant la reconnaissance des MAPK
- Une séquence N-ter responsable de la localisation sub-cellulaire

La première MKP identifiée fut Mkp-1, qui déphosphoryle de manière préférentielle les thréonines et tyrosines de p38 et Jnk et, dans une moindre mesure, ERK (Sun et al., 1993; Guan and Butch, 1995; Chi et al., 2006). De façon intéressante, dans des modèles de mammifères comme la souris, l'activation des MAPK par des facteurs de croissance ou sous condition de stress est capable d'induire l'activité de Mkp-1 et donc la mise en place d'une boucle de régulation avec feedback négatif (Kondoh and Nishida, 2007).

Dans l'ovocyte de xénope, seule Mkp-1 a été étudiée. C'est la seule MKP connue dans les ovocytes immatures et matures dans lesquels elle est exprimée de manière constitutive. Mkp-1 (DUSP1 / CL100) a été clonée. La micro-injection de Mkp-1 inhibe partiellement la synthèse de Mos indiquant que celle-ci pourrait être sous le contrôle de Erk. Mkp3, spécifique de ERK, n'est pas présente dans l'ovocyte de xénope, cependant, sa micro-injection bloque la poly-adénylation de l'ARNm de Mos induite par une MEK constitutivement active indiquant que ce rétrocontrôle pourrait agir sur la poly-adénylation (Howard et al., 1999).

Comme nous l'avons vu, l'activation du MPF et de la voie MPAK sont des acteurs centraux lors de la reprise de méiose. Toute perturbation de leur régulation entraine une défaillance de ce phénomène.

L'ensemble des évènements biochimiques intervenant de la reprise de méiose de l'ovocyte de xénope est récapitulé dans la figure 16



Figure 16 : Schéma récapitulatif des évènements biochimiques intervenant dans la reprise de méiose de l'ovocyte de xénope. Lorsque la progestérone se fixe sur son récepteur, elle entraine une inhibition de l'AC responsable de l'inhibition de

l'activité PKA. Cette inhibition est à l'origine d'une synthèse protéine permettant, entre autres, la synthèse de mos et de la cycline B. La synthèse de Mos sera à l'origine de la mise en place de la voie MAPK permettant l'inactivation de Myt1, et l'activation de Cdc25c, inhibiteur et activateur respectif du préMPF. Le MPF ainsi activité permet la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif de la synthèse protéique et de l'activité de Cdc25c. Flèches vertes : régulation au sein de la voie MAPK. Flèches bleus : Régulations liées au MPF. Flèche orange : Interaction entre le MPF et les MAPK. (Modifié d'après Beaujois R. 2010)

3.3. Arrêt en Métaphase II

Si l'arrêt en prophase I de méiose est commun à toutes les espèces, l'arrêt en métaphase II est caractéristique de la plus grande majorité des vertébrés.

Suite à la stimulation hormonale, on observe un second arrêt qui, selon les espèces, se produira en métaphase I, métaphase II ou encore au stade pronucleus après émission du second globule polaire. La fécondation entrainera la levée de ce second blocage.

3.3.1. Caractéristiques

Les caractéristiques principales de cet arrêt en métaphase II sont la présence d'un fuseau de métaphase et une activité MPF élevée. Mais la présence d'une activité CSF (Cytostatic Factor) est aussi importante pour cet arrêt.

À nouveau, Masui et Markert mirent en évidence un facteur impliqué dans le maintien du second blocage de méiose à l'aide de la micro-injection. La micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures non fécondés dans l'un des blastomères d'un embryon au stade deux cellules entraine un arrêt de la division de ce blastomère en métaphase alors que le blastomère non injecté poursuit ses divisions à un rythme normal (Masui and Markert, 1971). Les fuseaux métaphasiques de ces blastomères bloqués sont dépourvus d'asters, mais présentent des centrosomes (Meyerhof and Masui, 1979). Cette expérience a mis en avant l'existence d'un facteur capable d'induire l'arrêt de la division et donc le blocage en métaphase II : le CSF pour Cytostatic Factor.

Les molécules composant le CSF doivent répondre à des critères spécifiques pour rendre compte d'une activité CSF :

- Elles doivent être synthétisées au cours de la maturation méiotique.
- Elles doivent être présentes et fonctionnelles en MII
- Elles doivent être inactivées ou dégradées à la fécondation

Dans le cas de l'ovocyte d'amphibien, deux types d'activités CSF sont trouvées : CSF I et CSF II (Meyerhof and Masui, 1977, 1979). La différence majeure portant sur leur sensibilité au calcium. CSF 1, présent dans le cytosol, est sensible au calcium à l'inverse de CSF II qui lui est insensible. En effet, il reste stable en présence de fortes concentrations de calcium (Masui, 1974; Meyerhof and Masui, 1977). À l'inverse, l'utilisation d'EGTA, un chélateur des ions calcium, stabilise le CSF I (Meyerhof and Masui, 1977). En effet ce facteur cytostatique est instable et son activité, est stabilisée par la présence d'inhibiteurs de phosphatases comme le 13-glycérophosphate ou le fluorure de sodium, et par la présence d'ATP (Shibuya and Masui, 1988; Moses and Masui, 1990). Le CSF I dépend donc d'une ou plusieurs phosphoprotéines, actives lorsqu'elles sont phosphorylées (Shibuya and Masui, 1989).

3.3.2. Mos / MAPK

Mos serait responsable de l'arrêt CSF et permet la mise en place de son activité (Sagata et al., 1989b). L'injection d'ARNm de Mos dans un des blastomères d'embryon au stade deux cellules entraine un arrêt de la division en phase M. Parallèlement, l'injection de cytoplasme d'ovocyte bloqué en métaphase II immuno-déplété en Mos dans un blastomère, emmène une perte d'activité CSF (Sagata et al., 1989b). Dans les ovocytes de mammifère c-Mos est également exprimée (Paules et al., 1989) et dégradée durant la fécondation (Watanabe et al., 1989). Cette dégradation peut être corrélée avec la disparation de l'activité CSF pour la fécondation. L'injection d'oligonucléotides antisens de c-Mos empêche l'arrêt en métaphase et provoque la décondensation des chromosomes ainsi que la reformation de l'enveloppe nucléaire (O'Keefe

et al., 1989). L'injection d'anticorps dirigés contre c-Mos dans des zygotes de souris entraine une absence de clivage et maintient le zygote au stade pronucleus (Zhao et al., 1991).

C-Mos pourrait provoquer l'arrêt en métaphase II par le maintien de l'activité MPF et par inhibition de la dégradation de la cycline. En effet, lorsque des embryons sont injectés avec l'ARNm de c-Mos, on observe une absence de dégradation des cyclines et le maintien de l'activité MPF (Sagata et al., 1989b). Il est cependant à noter que la cinétique d'inactivation de Mos (90 minutes) n'explique pas la dégradation de la cycline (10 minutes) qui a lieu lors de l'activation. Puisque l'expression ectopique de c-Mos dans des ovocytes immatures n'induit pas la phosphorylation de la cycline B2 (Xu et al., 1992), la stabilisation de la cycline par c-Mos ne serait donc pas directe.

La voie MAPK induite par Mos joue-t-elle un rôle dans le maintien de l'activité CSF ? Lorsque l'on injecte MEK / MAPK / p90Rsk dans des blastomères on observe le même arrêt en métaphase (Haccard et al., 1993; Bhatt and Ferrell, 1999; Gross et al., 1999). De plus, lorsque l'on co-injecte c-Mos avec un anticorps neutralisant Mek1 (Kosako et al., 1994) ou un ARNm codant pour la phosphatase CL100 (Sagata, 1997) aucun arrêt n'est observé et la division reste normale. Cette phosphatase est connue pour être capable de déphosphoryler les MAPK Erk1 et Erk2. Elle bloque l'activation des MAPK dépendante de la voie Ras dans les extraits d'ovocytes de xénope bloqués en métaphase II (Alessi et al., 1993) et son expression ectopique provoque l'inactivation prématurée de MAPK, la dégradation de la cycline B et la sortie de phase M (Minshull et al., 1994).

La voie Mos/MAPK semble donc essentielle à l'arrêt en métaphase II.

3.3.3. Emi 2 (Early Mitotic Inhibitor 2)

Emi 2 (aussi connue sous le nom Erp1) fait partie du CSF en inhibant APC/C (Anaphasepomoting complex/cyclosome) (Peters, 2006), une E3 ligase, responsable de la dégradation de la cycline B et de la sortie de métaphase II (Tunquist and Maller, 2003; Tung et al., 2005; Schmitt and Nebreda, 2002; Shoji et al., 2006). Emi 2 est synthétisée durant la maturation ovocytaire et dégradée durant la fécondation pour être synthétisée de nouveau peu de temps après celle-ci (Liu et al., 2006; Madgwick et al., 2006; Ohe et al., 2007; Sagata et al., 1989a; Schmidt et al., 2005).

Emi2 est constituée d'une région régulatrice en N-ter et d'une région fonctionnelle en C-ter. Cette dernière contient une destruction box, qui rivalise avec les substrats de l'APC/C (dont la cycline B) pour la fixation de l'APC/C et une région de fixation du zinc (ZBR) qui semble inhiber l'activité ubiquitine ligase de l'APC/C (Miller et al., 2006; Schmidt et al., 2005). En outre, la queue se trouvant en C-terminal, dite queue RL, sert de site d'ancrage pour l' APC/C, permettant l'interaction inhibitrice de la destruction box et du ZBR avec l' APC/C (Ohe et al., 2010). La région N-terminale possède les signaux nécessaires à la dégradation rapide d'Emi2 lors de la fécondation, comprenant un site de phosphorylation de la CaMKII et un motif de destruction DSG reconnu par l'ubiquitine ligase SCFb -TrCP (Hansen et al., 2006; Liu and Maller, 2005; Rauh et al., 2005).

Dans l'ovocyte de xénope, la voie MAPK régule à la fois la stabilité et l'activité de Emi2, influençant ainsi l'arrêt en MII (Inoue et al., 2007; Nishiyama et al., 2007). Rsk phosphoryle de façon directe Emi2 sur sa région centrale (Inoue et al., 2007) et permet le recrutement de PP2A

sur Emi2. En retour, Emi2 influe sur l'activité APC/C afin de réguler le niveau de concentration de la cycline B (Wu et al., 2007).





Mais les MAPK ne sont pas les seules capables d'influencer l'activité d'Emi2. Cdc2 peut phosphoryler Emi2 (S43 a T267) et entrainer sa déstabilisation et son inactivation. Pour inhiber cette action, Mos recrute la phosphatase PP2A-B56b/ ε (Isoda et al., 2011; Tischer et al., 2012). De nombreux autres composants interviennent dans la régulation. On peut citer CK1 δ/ε qui se fixe au niveau de phosphorylations présentes dans la partie C-ter de Emi2 afin d'empêcher la fixation d'Emi2 sur l'APC/C ou encore Plk1 qui déstabilise Emi2 par phosphorylation. (Tischer et al., 2012) (Figure 17).

3.3.4. Point de contrôle du fuseau

L'arrêt CSF dépend de l'inhibition de l'APC/C. L'APC/C pour <u>A</u>naphase-<u>P</u>romoting <u>C</u>omplex est une E3 ubiquitine ligase qui marque les protéines du cycle cellulaire afin qu'elles soient dégradées par le protéasome. C'est un complexe constitué de 11-13 sous-unités protéiques. La principale fonction de l'APC / C est de déclencher le passage de la métaphase à l'anaphase par le marquage de protéines spécifiques devant être dégradées. Les trois protéines principales marquées pour la dégradation sont la sécurine et les cyclines S et M. La sécurine est une protéine qui inhibe la séparase, responsable de la protéolyse de la cohésine, le complexe de protéine qui permet la liaison des chromatides sœurs ensemble. Lorsque la sécurine subit une ubiquitination par l'APC/C, cela libère la séparase, qui dégrade la cohésine. Les chromatides sœurs deviennent libres de se déplacer vers les pôles opposés du fuseau. L'APC/C cible également les cyclines mitotiques, ce qui entraine l'inactivation du complexe M-CDK (mitotique kinases cyclinedépendantes), la sortie de la mitose et la cytocinèse.

Bien que les fuseaux des ovocytes soient normaux, un système original à l'ovocyte, comme la voie Mos/MAPK, pourrait activer le point du contrôle du fuseau, connu pour conduire à l'inactivation de l'APC/C. L'inhibition de l'APC/C est due à l'activation de composants du point de contrôle du fuseau (Vorlaufer and Peters, 1998; Tunquist and Maller, 2003). Comme

la déplétion de certaines protéines du point de contrôle du fuseau supprime la mise en place de l'arrêt CSF induit par Mos, il existerait un lien entre Mos et le point de contrôle du fuseau. Cependant, elles ne semblent pas nécessaires au maintien de l'activité CSF établi par mos. En effet l'immunodéplétion des protéines Bub1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1) et Mad2 (mitotic arrest deficient 2), deux protéines du point de contrôle du fuseau, dans des extraits d'ovocytes bloqués en métaphase II n'entraine pas la perte de l'activité CSF (Tunquist and Maller, 2003; Tunquist et al., 2002).

3.3.5. Cdk 2 / Cycline E

Cdk2 associée à la cycline E est le complexe Cdk/Cycline impliqué dans la transition G1/S des cellules somatiques. Il permet l'initiation de la réplication. Puis, complexée à la cycline A, la Cdk2 contrôle la progression de la phase S. Chez le xénope, elle s'associe à la cycline E et ce complexe s'accumule au cours de la méiose II (Rempel et al., 1995).

L'utilisation d'oligonucléotides antisens de Cdk2 entraine la levée de l'arrêt CSF (Gabrielli et al., 1993; Rempel et al., 1995). Cette activité peut être restaurée suite à la micro-injection de Cdk2 dans ces mêmes ovocytes.

Cependant, l'injection d'un inhibiteur spécifique des Cdk : p21^{cip1} n'affecte pas l'arrêt en métaphase II suggérant donc qu'il n'y a aucune Cdk impliquée dans ce phénomène (Furuno et al., 1997). Des études dans les extraits cyclants ont par la suite démontré que la voie MAPK et le complexe Cdk/Cycline sont suffisants indépendamment l'une de l'autre pour induire l'arrêt en métaphase II (Tunquist and Maller, 2003). Il existe donc une possibilité de compensation par la voie MAPK lors de l'utilisation de p21^{cip1}.

3.4. Réponse à l'endommagement de l'ADN dans les ovocytes

Cette partie s'intéresse à une particularité de l'ovocyte de xénope : il serait p53 inactif et donc ne serait pas sensible aux dommages à l'ADN. L'hydrogène sulfuré et le monoxyde d'azote, deux gazotransmetteurs que nous décrirons plus loin, sont tous les deux des génotoxiques La particularité de l'ovocyte de xénope nous permet de l'utiliser comme modèle d'étude des effets directs de ces gazotransmetteurs sur le cycle cellulaire indépendamment de leur effet génotoxique.

3.4.1. Le DNA Damage Response

Préserver l'intégrité du génome est un prérequis pour un fonctionnement optimal de la cellule et une transmission fidèle de celui-ci d'une cellule à l'autre. Les lésions de l'ADN sont un effet secondaire de la vie cellulaire comme des erreurs de réplication, la recombinaison non contrôlée, les mutations...

Les lésions de l'ADN sont engendrées par trois principales sources (Lindahl, 1993; Friedberg et al., 2006) :

- Des agents environnementaux tels que les ultraviolets, les radiations ionisantes et de nombreux composés chimiques.
- Les espèces réactives de l'oxygène ou Reactive Oxygen Species (ROS) générées via la respiration cellulaire et la peroxydation des lipides.
- L'hydrolyse spontanée des résidus des nucléotides.

Les processus essentiels de la cellule, tels que la transcription et la réplication, sont altérés par les lésions de l'ADN. La réplication d'ADN endommagé induit des mutations pouvant déclencher des processus de tumorigenèse. Ces lésions peuvent aussi entrainer la sénescence ou l'apoptose de la cellule ou un vieillissement accéléré (Mitchell et al., 2003; Akbari and Krokan; Sinclair and Oberdoerffer, 2009). Afin de répondre à ce phénomène d'endommagement de l'ADN, la cellule a mis en place des mécanismes de contrôle : le DNA Damage Response (DDR). Le DDR peut être divisé en une série de voies dépendantes du type de lésion de l'ADN (Figure 18). Elles présentent cependant des étapes communes :

- 1. La détection des dommages
- 2. La mobilisation des facteurs réparateurs de l'ADN au site d'endommagement
- 3. La réparation de l'ADN

Le contrôle génétique de la progression du cycle cellulaire en réponse à l'endommagement de l'ADN a tout d'abord était observé avec le système SOS chez d'Escherichia Coli (George et al., 1975) puis dans les cellules issues d'un individu porteur de la maladie ataxia telangiectasia de mammifères, mutées pour le gène homologue. Ce gène fut donc nommé ATM pour <u>A</u>taxia <u>T</u>elangiectasia <u>M</u>utated gene (Painter and Young, 1980). Ce phénomène fut par la suite observé dans la levure et c'est dans cet organisme que le terme de « checkpoint » fut utilisé pour la première fois (Weinert and Hartwell, 1988).

Figure 18 : De nombreux mécanismes de réparation de l'ADN sont à l'origine du maintien de la stabilité génomique. L'ADN est constamment exposé à des agressions causant des lésions. Le choix du mécanisme de réparation de l'ADN est largement dépendant du type de lésion, mais aussi d'autres paramètres, tel que par exemple la phase du cycle de la cellule au moment de l'endommagement de son ADN. Quelques protéines clés impliquées dans chaque mécanisme sont indiquées dans



le schéma. BER : Base Excision Repair, NER : Nucléotide Excision Repair, NHEJ : Non Homologous End-Joining. (Librement adaptée depuis Lord and Ashworth, 2012 (Lord and Ashworth, 2012).

Le checkpoint d'endommagement de l'ADN a été, initialement, définie comme une voie de signalisation non essentielle qui contrôle la capacité d'une cellule à stopper son cycle en réponse

à des dommages de l'ADN, lui permettant ainsi de les réparer. Ce checkpoint se compose de voie de signalisation contrôlant : l'activation des voies réparatrices de l'ADN (Cortez et al., 1999; Lim et al., 2000; Gatei et al., 2000; Zhao et al., 2000; Wu et al., 2000), le mouvement des protéines réparatrices de l'ADN jusqu'au site d'endommagement (Martin et al., 1999; Mills et al., 1999), l'activation de programmes de transcription (Elledge, 1996), et, selon le niveau des dommages l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Lowe et al., 1993; Clarke et al., 1993; Xu and Baltimore, 1996; Roos and Kaina, 2006).

3.4.2. Les dommages à l'ADN induit par les ROS

Dans le cadre de cette thèse, les dommages à l'ADN entrainés par les ROS nous intéressent particulièrement du fait de la capacité des gazotransmetteurs à en produire.

Les ROS sont des espèces chimiques à très forte réactivité capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les membranes des cellules (péroxydation des lipides constitutifs). La cellule produit naturellement des ROS par différents mécanismes comme par exemple la respiration mitochondriale. Cependant, certains facteurs internes ou externes à la cellule peuvent conduire à la formation surnuméraire de ROS et le stress oxydatif engendré peut alors devenir délétère pour la cellule. Les ROS sont à l'origine de cassures de l'ADN (simple et double brins) entrainant la mise en place du DDR par la voie dite « p53 dépendante » (Pour revue, voir : Ray et al. 2012).

Le facteur de transcription p53 est impliqué dans l'arrêt transitoire du cycle cellulaire de la cellule en réponse à l'endommagement de l'ADN ou en cas de mutation afin de permettre à la cellule de réparer son ADN. Cette protéine est aussi nommée « le gardien du génome ». Lorsque la réparation est impossible, p53 maintient le blocage et oriente alors la cellule vers un mécanisme de mort, principalement par apoptose. Il est estimé qu'une mutation fonctionnelle de *TP53*, le gène codant pour la protéine p53, se produit dans 50% des cancers humains (Vousden and Lu, 2002).

Lorsque la cellule n'est pas soumise à un stress oxydatif sévère, le niveau d'expression de p53 est extrêmement bas dans la plupart des tissus, du fait du court temps de vie de la protéine (Woods and Vousden, 2001). Dans des conditions physiologiques normales de température, la protéine WT de p53 est majoritairement non structurée (dépliée à plus de 50%) et montre de faibles capacités de liaison à l'ADN (Bell et al., 2002). De nombreux mécanismes post-transcriptionnels, tels que des phosphorylations, des acétylations et des sumoylations, contribuent à la stabilisation et l'activation de cette protéine (pour revue, voir Woods & Vousden 2001).



Figure 19 : Voie d'apoptose p53-dépendante en réponse aux ROS : Flèches vertes : Niveau de ROS physiologique, le stress oxydatif n'entraine pas de réponse apoptotique de la cellule. **Flèches noires :** En présence d'un haut taux de ROS le stress oxydatif devient cytotoxique et entraine une réponse apoptotique de la cellule. (Librement adapté depuis P53 and ROS : a convoluted story de (Liu, 2007))

Lorsque le niveau de ROS augmente, le stress oxydatif devient cytotoxique. La protéine p53 subit alors une translocation vers la mitochondrie. Dans les mitochondries, p53 inhibe directement les protéines anti-apoptotiques MnSOD, Bcl-2 et Bcl –xL et active les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad. Ces évènements conduisent à une augmentation des ROS et à une libération du cytochrome c qui déclenchent la cascade des caspases et donc l'apoptose. p53 subit, plus tardivement, une translocation vers le noyau, où il transactive des protéines pro-oxydatives et inhibe la transcription de protéines antioxydantes, induisant une augmentation des ROS. Cette augmentation a pour but de réguler positivement la production de p53 (Liu, 2007). L'ensemble de ces évènements est résumé dans la figure 19.

3.4.3. L'ovocyte de xénope : un modèle p53 inactif

Si l'absence de DDR dans les embryons de xénope jusqu'à la transition blastuléenne est aujourd'hui un fait établi et admis (pour revue voir (Peng et al., 2014), la présence ou non d'un DDR fonctionnel dans les ovocytes de xénope n'est pour le moment pas clairement démontrée.

La protéine p53 ne serait pas fonctionnelle dans l'ovocyte de xénope, (Tchang et al., 1993) mais est tout de même présente (ARN et protéine). La protéine p53 est exprimée à partir du stade III de l'ovogenèse et augmente rapidement par la suite pour atteindre son plus haut taux d'expression dans les ovocytes de stade VI. Ce niveau de p53 est maintenu constant durant les phases du développement du xénope, jusqu'au stade têtard. L'inactivation de p53 serait en partie due à sa localisation puisque cette protéine, présente en très grande quantité, est localisée majoritairement dans la fraction cytoplasmique de l'ovocyte (Tchang et al., 1993), sans que

cela puisse être imputé à l'absence du signal de localisation nucléaire (Soussi et al., 1990; Shaulsky et al., 1990). De même, d'autres protéines connues pour être nucléaires, telles que PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), sont retrouvées dans la fraction nucléaire de l'ovocyte indiquant que le stockage de p53 dans le cytoplasme serait caractéristique ou spécifique de cette protéine.

D'autres exemples de cette absence de localisation nucléaire de p53 ont été reportés dans des fibroblastes embryonnaires 3T3 non transformés (Rotter et al., 1983). Dans les cellules embryonnaires fibroblastiques de souris Balb/c 3T3, p53 s'accumule dans le cytoplasme durant la phase G1 et n'entre dans le noyau que peu de temps avant le début de la synthèse d'ADN ; lorsque la cellule progresse en phase S, p53 est peu à peu relocalisée dans le cytoplasme (Shaulsky et al., 1990). Aussi, la présence de p53 cytoplasmique dans l'ovocyte de xénope n'apparait pas un cas isolé. Un ovocyte est une cellule arrêtée en prophase I de méiose, stade où la synthèse d'ADN est complète. Cet arrêt dans le cycle cellulaire pourrait expliquer la localisation de p53.

De même, durant l'ovogenèse il est observé un fort taux de transcription, permettant un stockage des ARNm maternels qui soutiendront les activités nécessaires au développement précoce. La localisation cytoplasmique de p53 serait un mécanisme permettant d'éviter la répression de la transcription des gènes maternels par cette protéine. En effet, l'injection de p53, d'humain ou de xénope, dans le noyau d'ovocytes de xénope est suffisante pour entrainer une répression de la transcription dans ces ovocytes (Amariglio et al., 1997). La présence cytoplasmique de p53 s'accompagne d'une inactivité de la protéine puisque, ainsi localisée, p53 ne peut accomplir sa fonction de facteur de transcription. L'ovocyte de xénope peut être défini comme un modèle p53 inactif.

Partie IV : Les gazotransmetteurs

4.1. Généralités

L'intervention des gazs comme messagers moléculaires dans les cellules repose sur l'observation de la capacité du monoxyde d'azote à être un vasodilatateur et un acteur de la réponse immunitaire des macrophages (Review : Moncada et al. 1991). Cependant, durant de nombreuses années et d'après les premières études, le monoxyde d'azote ne fut désigné que comme un neurotransmetteur ou neuromodulateur, cantonné au cerveau et système nerveux périphérique (Bredt et al., 1990; Bredt and Snyder, 1989; Nelson et al., 1995).

Le second gaz identifié comme gazotransmetteur fut le monoxyde de carbone, lui aussi produit de manière physiologique. Parce qu'il n'était pas produit seulement au niveau du cerveau, mais aussi notamment au niveau de l'intestin (Verma et al., 1993; Zakhary et al., 1997; Xue et al., 2000; Boehning et al., 2004), le terme de gazotransmetteur ou gazomédiateur fut utilisé afin de désigner un gaz transmettant des informations dans différentes parties du corps autre que le cerveau.

Les gazotransmetteurs se définissent donc comme des gaz produits par l'organisme, ayant la capacité de traverser librement les membranes et transmettant des informations dans le corps de façon générale. Pendant longtemps, l'hydrogène sulfuré n'a pas été classé comme gazotransmetteur car sa production n'avait pas été détectée dans l'organisme. En effet, dans le corps, les bactéries et plus particulièrement celles de la flore intestinale sont la source la plus abondante de H₂S. Récemment, la découverte d'enzymes responsables du métabolisme de l'H₂S dans les cellules eucaryotes du cerveau fit entrer ce gaz dans la famille des gazotransmetteurs.

4.2. L'hydrogène sulfuré

4.2.1. Généralités

C'est en 1777 que Carl Wilhelm Scheele caractérisa pour la première fois l'hydrogène sulfuré (H₂S) dans « *Chemische Abhandlung von der Luft und dem Fueur* » (Observation chimique de l'air et du feu). Considéré surtout comme un polluant environnemental, le H₂S est également reconnu comme un membre de la famille des gazotransmetteurs avec le monoxyde d'azote et le monoxyde de carbone. Il diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires sans transporteur (Szabó, 2007), ce qui fait de lui un second messager rapide.

H₂S est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques. L'hydrogène sulfuré est produit de façon endogène dans de nombreux organes (foie, rein, poumon, cerveau, cœur, thymus, testicules) (Wang 2002, Li and Moore 2008) et sur les sites inflammatoires (Szabó, 2007). Ce gaz, incolore et inflammable, possède une odeur caractéristique d'œufs pourris. Lorsque sa concentration est inférieure à 1 ppm, il est soluble dans l'eau (1 g dans 242 mL à 20°C). Ce gaz est mortel à fortes concentrations (Tableau 3). Dans l'eau et le plasma, l'H₂S est un acide faible dont le pKa à 37°C est de 6,76. La concentration d'hydrogène sulfuré contenue dans le cerveau, le plasma et d'autres tissus a été mesurée et des doses remarquablement hautes ont pu être détectées. Par exemple, dans le plasma de rat ou d'humain, une quantité approximative de 50 μM d'hydrogène sulfuré a pu être mesurée (Zhao et al., 2001) ainsi que

des concentrations jusque 100 μ M dans des homogénats de cerveau de rat (Richardson et al., 2000). Des concentrations d'H₂S de 0,3 à 3,4 mM sont retrouvées dans les fèces humaines (Florin, 1991; Pochart et al., 1992; Richardson et al., 2000).

Concentration d'exposition (mg/m ³)	Effets	Référence
0,011	Seuil pour sentir l'odeur	(Amoore and Hautala, 1983)
2,8	Constriction branchiale chez les individus asthmatiques	(Jäppinen et al., 1990)
5,0	Augmentation des douleurs oculaires	(Vanhoorne et al., 1995)
7 ou 14	Augmentation de la concentration en lactate du sang, baisse de l'activité citrate synthase du muscle squelettique, baisse dans le taux d'oxygène dans le sang	(Bhambhani and Singh, 1991)
5-29	Irritation oculaire	(IPCS, 1981)
28	Fatigue, perte d'appétit, maux de tête, irritabilité, perte de mémoire, vertiges	(Ahlborg, 1951)
>140	Paralysies olfactives	(Hirsch and Zavala, 1999)
>560	Détresse respiratoire	(Spolyar, 1951)
>700	Mort	(Beauchamp et al., 1984)

À un pH physiologique (7,4), il existe moins de 20% de H_2S en solution en tant que composé non dissocié et le reste est dissocié de HS (anion hydrosulfide) et H⁺. La dissociation du HS en anion sulfide (S) se produit uniquement à pH élevé et est insignifiante en conditions physiologiques. Puisque H₂S et HS coexistent de façon permanente en solution aqueuse, il est possible de séparer leurs effets et de conclure sur leurs implications respectives dans les processus de signalisation.

4.2.2. Biosynthèse et Catalyse

L'H₂S est synthétisé, dans les tissus de mammifère, par des enzymes endogènes et/ou par une voie non enzymatique consistant en la réduction de thiols et de molécules contenant du thiol. Les enzymes responsables de la synthèse d'H₂S sont conservées au cours de l'évolution et sont produites dans de nombreuses espèces comme dans des organismes modèles tels que *S. Pombe*, ainsi que chez les mammifères. Trois enzymes sont responsables du métabolisme du l'H₂S (Figure 20) :

- La cystathionine-β-synthase (CBS)
- La cystathionine-γ-lyase (CSE)
- La 3-mercapto-sulfurtransferase (3-MPST ou MPST)

Les cystathionines servent d'intermédiaire dans divers cycles impliquant des acides aminés soufrés.



Figure 20 : Métabolisme de l'H2S. Trois enzymes sont responsables de la formation de l'H2S au sein de la cellule. La CBS (cystathionine- β -synthase), la CSE (cystathionine- γ -lyase) et MPST (3-mercapto-sulfurtransferase) permettent la formation d'H2S à partir de la cystéine par trois voies de synthèse.

Le gène CBS est localisé sur le chromosome 21 chez l'Homme en 21q22.3 (Münke et al., 1988). Chez l'Homme et la souris, CBS existe sous la forme d'un homotétramère ayant un poids moléculaire de 63 Kda. Chaque sous-unité est capable de se lier à différents cofacteurs tel que la S-adenosyl-methionine (SAM) et l'hème (Miles and Kraus, 2004; Banerjee and Zou, 2005). L'hème semble être un capteur du potentiel redox, tandis que SAM est un activateur allostérique de l'enzyme. La liaison de l'hème de CBS se fait en partie N-terminale alors que SAM se fixe sur le domaine C-terminal de la protéine. La partie C-terminale de CBS contient une répétition en tandem de deux domaines "CBS" qui semblent agir comme inhibiteurs de la fonction enzymatique puisque leur suppression active CBS (Shan and Kruger, 1998; Taoka et al., 1998; Kery et al., 1998). Ces domaines CBS peuvent être sumoylés sur la Lysine 211. Cette sumoylation entraine la localisation nucléaire de la protéine, expliquant la quantité relativement forte de CBS dans le noyau (Kabil et al., 2006; Agrawal and Banerjee, 2008). Les niveaux élevés de CBS dans le cerveau, ont entrainé la proposition que CBS est la principale source physiologique de formation de H₂S (Abe and Kimura, 1996). Néanmoins, il a ensuite été prouvé que cette enzyme est exprimée dans la foie, les reins, le cerveau, l'iléon, l'utérus, le placenta et les îlots de Langherans du pancréas (Kimura, 2011).

La CSE, produite dans le foie, les reins, l'aorte thoracique, l'iléon, la veine porte, l'utérus, le cerveau, les îlots pancréatiques et le placenta (Kimura, 2011), est sélectivement activée par le couple calcium/calmoduline (Yang et al., 2008). La preuve définitive que la CSE est une source physiologique d'H₂S fut établie chez des souris knock-out CSE (Yang et al., 2008). En effet, ces souris montrent des niveaux de H₂S dans l'aorte et le cœur réduits d'environ 80 % *versus* une réduction de 50 % chez les souris hétérozygotes. Les taux sériques d'H₂S dans les souris knock-out homozygotes et hétérozygotes sont réduits respectivement de 50% et 20%. L'étude de ces souris nullizygotes pour CST permit d'établir le CSE comme un produit de la physiologie normale des mammifères, mais aussi comme une source d'H₂S.

La MPST est l'enzyme du métabolisme d'H₂S découverte le plus récemment. Son importance a été démontrée par l'utilisation de souris KO. Il a été prouvé que le H₂S est produit à partir de la cystéine dans des homogénats de cerveau de souris knock-out CBS et que le production dépend de la présence d' α -cétoglutarate (Shibuya et al., 2009b). Ces observations ont suggéré qu'il existait une autre enzyme produisant du H₂S, qui n'est ni CBS ni CSE. Sa localisation a tout d'abord été désignée comme étant neuronale, mais elle est aussi présente dans le foie, les reins, le cœur, les poumons, le thymus, les testicules, l'aorte thoracique et le cerveau (Kimura, 2011) ; elle agirait de concert avec une cystéine aminotransférase (CAT) pour former le H₂S (Shibuya et al., 2009b). Il a été proposé que MPST ne soit pas une enzyme clé du métabolisme du H2S, mais un intermédiaire (Shibuya et al., 2009b).



Figure 21 : Biosynthèse et la dégradation de l'hydrogène sulfuré (H2S) dans des cellules de mammifères (modifié depuis (Li et al., 2011)). L'H₂S est synthétisé à l'intérieur de la cellule à partir de la cystéine *via* la cystathionine γ -lyase (CSE), la β -synthetase cystathionine (CBS), ou 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MPST) comme une extension de la voie de transsulfuration. L'interconversion d'acides aminés et de métabolites contenant du soufre est réalisée par la cystéine aminotransférase (CAT), la cystéine dioxygénase (CDO), et cystéine lyase (CL). GSSG = glutathion oxydé, GSH = glutathion réduit, R-SH représente un intermédiaire thiol, SO = sulfite oxydase, TSMT = thiol S-méthyltransférase.

L'H₂S est produit *via* la L-cysteine par quatre voies différentes : la cystathionine- β -synthase (CBS, EC 4.2.1.22) agit sur la L-cystéine pour produire de l'H₂S et de la L-sérine ; la cystathionine- γ -lyase (CSE, EC 4.4.1.1) forme de la thiocystéine à partir de la cystine qui est réarrangée pour former de l'H₂S ; la cystéine aminotransferase (CAT, EC 2.6.1.3) catalyse la réaction de la L-cysteine avec des cétoacides (α -kétoglutarate) pour former de la 3-mercaptopyruvate qui est ensuite désulfurée par la 3-mercapto-sulfurtransferase (3MST, EC 2.8.1.2) afin de former de l'H₂S ; enfin, la cystéine lyase (CL, EC 4.4.1.10) convertit la L-cysteine et du sulfite en L-cysteate et H₂S. Le Pyridoxal 5'-phosphate (PPP) est un cofacteur indispensable de CBS, CAT, CSE et CL alors que 3MST est dépendant du zinc. CAT et 3-

MPST sont toutes deux mitochondriales alors que CBS et CSE seraient exclusivement cytosoliques (Li et al., 2011) (Figure 21).

Les mécanismes du métabolisme du H₂S n'ont pas totalement été élucidés. Néanmoins, certaines voies de catalyse sont déjà connues. H₂S réagit avec la méthémoglobine pour former de la sulfhémoglobine. De plus, l'H₂S est rapidement oxydé en thiosulfate (S₂O₃²⁻) par la mitochondrie puis est converti en sulfite (SO₃²⁻) et en sulfate (SO₄²⁻). L'H₂S subit également une méthylation par du thiol-S-méthyltransférase (EC 2.1.1.9) pour donner du méthanéthiole (CH₃SH) et du sulfure de diméthyle (CH₃SCH₃), et il est également un substrat (en particulier dans le côlon) pour la rhodanése (thiosulfate : cyanure sulfurtransférase; CE 2.8.1.1), conduisant à la formation de thiocyanate (SCN-) et SO₄²⁻. Mais, bien que le H₂S soit utilisé de différentes manières, il reste un agent réducteur puissant, susceptible d'être consommé par les espèces oxydantes endogènes dans le système vasculaire, comme la péroxynitrite (Whiteman et al., 2004), supéroxyde (Chang et al., 2008), et le péroxyde d'hydrogène (Geng et al., 2004b). À ce titre, l'H2S fait partie de la famille des espèces réactives du soufre, famille incluant les thiols, les S-nitrosothiols, les acides sulféniques et les sulfites. L'ensemble des réactions de biosynthèse et de catabolisme de l'H₂S est résumé dans la figure 21.

4.2.3. Effets tissulaires

Des études récentes ont posé l' H_2S comme une molécule signal ayant un rôle dans de nombreux processus physiologiques : la réaction inflammatoire, la prolifération cellulaire, des effets sur le système cardiovasculaire et nerveux (Li et al., 2011; Baskar and Bian, 2011; Li and Moore, 2008). Les thématiques portant sur les effets de l' H_2S sur le système sanguin, cardiovasculaire et à la réaction inflammatoire restent les plus largement étudiées à ce jour.

4.2.3.1. Effets sur les vaisseaux sanguins

H₂S provoque la relaxation des vaisseaux sanguins (Zhao et al., 2001). L'utilisation de souris KO pour la CSE a permis d'étudier l'hypothèse que le H₂S soit un EDRF (Endothelium-derived relaxing factor), c'est-à-dire un composé produit et libéré par l'endothélium pour favoriser la relaxation des muscles lisses. Les souris nullizygotes pour CSE développent une hypertension dépendante de l'âge. La pression artérielle des hétérozygotes ressemble à celle des homozygotes à un âge précoce, mais à dix semaines, les souris homozygotes affichent des niveaux plus élevés de 10 mm Hg que les hétérozygotes. La différence la plus importante est caractérisée après douze semaines, avec des pressions sanguines jusqu'à 18 mm Hg plus élevées que pour les souris témoins (Yang et al., 2008; Nelson et al., 1995). Cette différence d'hypertension dépendante de l'âge peut être mise en parallèle aux taux d'expressions du CSE qui atteignent des niveaux maximum trois semaines après la naissance (Ishii et al., 2004).

Cependant, comme la relaxation du muscle vasculaire lisse n'a pas été affectée ou seulement légèrement améliorée, en présence de l'endothélium et du donneur de H_2S , des doutes ont été émis sur la classification du H_2S comme EDRF. Une nouvelle hypothèse fut donc posée selon laquelle le H_2S pourrait plutôt stimuler l'endothélium pour libérer des EDRF ou des EDHF (Endothelium-derived hyperpolarizing factor) et interagir avec eux, hypothèse invalidée par la suite (Zhao et al., 2001). L'hypothèse que tous les EDRF ne soient pas strictement semblables a alors été émise (Hosoki et al., 1997; Zhao and Wang, 2002). L'EDRF le plus connu est le monoxyde d'azote, aussi le composé EDRF produit par les cellules endothéliales en culture en présence de H_2S a été comparé avec ce dernier. Il a été démontré qu'il existait des différences entre le NO et le EDRF produit en présence de H_2S , telles que l'absence de la capacité à

détendre le muscle lisse ou la capacité à hyperpolariser les muscles lisses (Shikano et al., 1988; Chen et al., 1988). Ces nouveaux EDRF ont donc été désignés comme EDHF (hyperpolarizing factor) (Chen et al., 1988).

Des recherches ultérieures ont démontré la présence de presque toutes les enzymes du métabolisme de H_2S au niveau des cellules endothéliales chez le rat, remettant en cause les affirmations précédentes (Shibuya et al., 2009b; a). Encore aujourd'hui l' H_2S est considéré comme un potentiel candidat des EDRF.

4.2.3.2. Effets sur l'inflammation

Il existe une littérature abondante et contradictoire sur les rôles potentiels de H_2S dans l'inflammation. Certaines études indiquent que l' H_2S endogène serait anti-inflammatoire. L'inhibiteur de CSE, le β -CNA, augmente nettement l'adhérence des leucocytes à l'endothélium (un des premiers évènements de l'inflammation, associée à leur migration ultérieure dans le tissu sous-jacent) dans le cas d'un œdème de la patte provoqué par le carraghénane. Les donneurs de H_2S montrent des effets anti-inflammatoires en inhibant la fixation des leucocytes sur l'endothélium et la réduction de l'œdème induit par le carraghénane (Zanardo et al., 2006). Les donneurs de H_2S réduisent la douleur viscérale dans un modèle de distension colorectale (Distrutti et al., 2006) et sont capables de diminuer la colite chez les rats (Fiorucci et al., 2007).

Au contraire, certaines études indiquent une action pro-inflammatoire de H_2S . Les niveaux de H_2S et d'expression de CSE sont augmentés dans plusieurs modèles d'inflammation, et l'inhibiteur de CSE, GCP, réduit l'inflammation dans certains de ces modèles (Mok et al., 2004; Bhatia et al., 2005b; a; Collin and Thiemermann, 2005). De plus, l'utilisation de NaHS sur des cellules U937 de lymphome, induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β) en régulant positivement le NF-kB (Nuclear Factor-Kappa B) et en entrainant une activation de la voie MAPK (Zhi et al., 2007).

Une autre étude a relié l' H_2S et l'inflammation. Cette étude a montré pour la première fois que les taux d' H_2S sont plus élevés dans le liquide synovial de genou de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ou d'arthrose comparés à un groupe contrôle (Whiteman et al., 2010). Ces niveaux sont corrélés aux conditions inflammatoires des patients atteints de ces maladies.

4.2.3.3. Effets sur le système nerveux

4.2.3.3.1. Action sur les cellules neurales et gliales

À des concentrations physiologiques (plasma $\approx 50 \ \mu$ M, cerveau $\approx 100 \ \mu$ M), l'H₂S améliore la potentialisation à long terme (LTP). Le NaHS, un donneur de H₂S, ou de faibles stimulations tétaniques de tranches d'hippocampe de rat utilisé individuellement ne sont pas capables de susciter des LTP, tandis que l'application simultanée des deux conduit à de fortes LTP (Abe and Kimura, 1996). L'effet du H₂S sur les LTP est aboli par les antagonistes des récepteurs NMDA. Les récepteurs NMDA possèdent des cystéines réactives, il est donc possible que le H₂S régule ces récepteurs par le biais de S-Sulfhydration (voir section 4.2.4.).

Outre ses actions sur les neurones, H₂S semble aussi capable d'influencer les astrocytes (Nagai et al., 2004) et jouerait aussi un rôle de médiateur dans l'interaction entre les neurones et leur environnement glial. Les cellules gliales assurent le maintien de l'homéostasie, produisent la myéline et jouent un rôle de soutien et de protection du tissu nerveux en apportant les nutriments et l'oxygène, en éliminant les cellules mortes et en combattant les pathogènes. Bien que les cellules sans modification électrique soient définies comme appartenant à la glie, des études

récentes ont montré que les cellules gliales sont, en réalité, des cellules électriquement actives, présentant des récepteurs aux neurotransmetteurs et capables de répondre lorsque des messages leurs sont transmis (Cornell-Bell et al., 1990). Les donneurs de H₂S provoquent des vagues d'augmentation du niveau intracellulaire de calcium dans les astrocytes. L'augmentation de calcium intracellulaire survient rapidement après l'exposition aux donneurs de H₂S puis disparait lentement, alors que les vagues de calcium décroissent rapidement. Il existe des interactions réciproques entre les neurones et les cellules gliales : l'activité neuronale entraine des vagues de calcium au niveau des cellules gliales, et ces vagues de calcium gliales conduisent l'activité neuronale (Dani et al., 1992). La vague de Ca₂₊ semble, dans la plupart des cas, être activée sur les sites de contact avec des neurones, ce qui suggère que cette vague gliale est amorcée par l'excitation neuronale (Charles, 1994).

4.2.3.3.2. Neuroprotection

L'H₂S peut également intervenir en tant que neuroprotecteur, notamment dans le cadre de la neurotoxicité induite par le glutamate. Dans les cultures de cellules du cerveau, cette neurotoxicité implique, au moins en partie, l'inhibition de l'absorption de la cystine. Une cystine / glutamate antiporteur entraine un afflux de cystine et un efflux de glutamate. Ce processus est bloqué par une forte concentration de glutamate exogène qui est cytotoxique via un processus nommé oxytosis (Tan et al., 2001). Le glutamate permet de réduire les niveaux de glutathion intracellulaire, et ils sont tous deux augmentés en présence de H₂S dans les cellules non traitées ou exposées au glutamate (Kimura and Kimura, 2004). Le glutathion est produit par le métabolisme séquentiel de deux enzymes, la c-glutamyle cystéine synthétase (c-GCS) et la glutathion -synthétase (GS). H₂S augmente l'activité de c-GCS et les niveaux de c-glutamyle cystéine, mais il n'a aucun effet sur GS (Kimura and Kimura, 2004). Les niveaux d' ARNm et de protéines de c-GCS ne sont pas modifiés dans les cellules exposées à H₂S, et l'activité de c-GCS dans des homogénats du cerveau n'est pas affectée en présence de H₂S (Kimura et al., 2010). Ces observations indiquent que l'amélioration de l'activité c-GCS par H₂S n'est causée ni par la régulation transcriptionnelle, ni par le contact direct de c-GCS avec H₂S. Puisque l'activité de c-GCS est renforcée uniquement lorsque les cellules sont exposées à H₂S, l'hypothèse émise est l'activation de récepteurs sur la surface de la cellule pour initier un signal intracellulaire qui peut améliorer l'activité de l'enzyme. Appuyant ce modèle, le buthionine sulfoximine, qui inhibe la γ -glutmaylecysteine synthase (CE 6.3.2.2), une enzyme limitante dans la biosynthèse du glutathion, empêche le H₂S de provoquer une augmentation du glutathion et donc la survie des cellules. Le H₂S provoque une augmentation du glutathion en stimulant l'entrée de cystine dans les cellules, inversant alors l'inhibition du transport de cystine par le glutamate (Kimura and Kimura, 2004).

Enfin, outre la protection contre la toxicité de l'oxydation du glutamate, H_2S protège les cellules contre le stress oxydatif, tel que celui causé par H_2O_2 (Kimura et al., 2010)

4.2.3.4. Effets au niveau cardiovasculaire

Comme il protège les neurones du stress oxydatif (Kimura and Kimura, 2004), le H₂S protège aussi le muscle cardiaque contre l'ischémie. Appliqué de manière exogène, H₂S diminue la nécrose des tissus après infarctus, induite par l'isoprotérénole et baisse le taux de mortalité (Geng et al., 2004a). Il est également capable d'atténuer la diminution de la contractilité du myocarde induite par l'isoprotérénole. Un donneur de H₂S, le NaHS, permet de réduire la zone de nécrose de l'infarctus, induite par la ligature de l'artère du coronaire gauche. Cette protection peut être inhibée par l'utilisation de bloqueurs des canaux KATP (canaux potassiques sensibles

à l'ATP), la glibenclamide ou le sodium 5-hydroxydecanoate (Johansen et al., 2006). L'activation des canaux KATP ainsi que des canaux CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) protège les neurones contre le stress oxydatif par la stabilisation du potentiel de membrane (Kimura et al., 2006). Le même mécanisme pourrait également être impliqué dans la protection du myocarde contre les lésions ischémiques.

L'application du H₂S au moment de la reperfusion limite la taille de l'infarctus et préserve la fonction ventriculaire gauche (Elrod et al., 2007). Des souris transgéniques ayant une surexpression de CSE présentent une augmentation des niveaux de H₂S au niveau du myocarde ainsi qu'une réduction de la taille de l'infarctus après une ischémie induite par reperfusion. L'analyse histologique montre que l'administration de H₂S permet de diminuer sensiblement l'hémorragie et la nécrose ainsi que le nombre de leucocytes dans la zone ischémique. Le H₂S diminue également les niveaux d'interleukine-1 du myocarde et d'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales (Elrod et al., 2007).

4.2.3.5. Effets sur le système reproducteur et la reproduction

Les trois enzymes du métabolisme de l'H₂S sont détectées dans les organes de reproduction, aussi bien chez le mâle que la femelle (Srilatha et al., 2009; Patel et al., 2009; Sugiura et al., 2005). Les taux d'expression de ces protéines suggéraient qu'elles puissent exercer un rôle au sein de ces organes ou que des altérations du métabolisme de H₂S puissent conduire à des anomalies de reproduction. La majorité des recherches reliant H₂S et la reproduction chez le mâle se sont focalisées sur les capacités de H₂S en tant que vasodilatateur, et potentiel correcteur de troubles de l'érection (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2009; Srilatha et al., 2006). La fonction pro-érectile de H₂S a été décrite chez le rat, le lapin (Srilatha et al., 2007), les primates (Srilatha et al., 2006) et l'homme (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2009). Des profils d'expression différents ont été rapportés dans les testicules de rat, pour CBS et CSE, où CSE est détectée seulement dans les cellules de Sertoli tandis que CBS est observée dans les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les gamètes (Sugiura et al., 2005). Si un rôle pour H₂S a pu être suggéré dans la physiologie du testicule (Oi et al., 2001), cette hypothèse n'a pas été largement étayée, ni relayée.

Chez la femelle, les enzymes du métabolisme de H₂S ont été détectées au niveau du vagin, de l'utérus et des ovaires, ainsi qu'au niveau du placenta et des tissus embryonnaires (Srilatha et al., 2009; Patel et al., 2009; Zhu et al., 2011). Il a été notamment démontré que le H₂S était produit de façon ubiquitaire tout au long de l'épithélium des trompes de Fallope et qu'il était nécessaire à la relaxation des contractions spontanées de l'oviducte. Lorsque le métabolisme du H₂S est perturbé de façon pharmacologique (par l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes) ou génétique, on observe une rétention des embryons dans l'oviducte et un retard de développement (Ning et al., 2014). Ce type d'étude corrobore les observations selon lesquelles l'altération du taux métabolique de H₂S est associée à une augmentation du taux d'avortements spontanés (Hemminki and Niemi, 1982). De manière générale, les effets de H₂S dans les tractus génitaux ont été attribués aux effets vasodilateurs de H₂S (Bhatia, 2005). Au niveau du placenta, les effets de H2S seraient relatifs à l'hypoxie, notamment dans le cas de pré éclampsie (Soleymanlou et al., 2005; Patel et al., 2009). Une première étude s'était intéressée aux effets du H₂S sur la fertilité et le développement de la progéniture de rats mâles vierges et femelles Sprague-Dawley, rats blancs non consanguins. Les rats femelles avaient été exposées au H₂S 6h/jour 7 jours/semaine, à des concentrations de 10 à 80 ppm durant deux semaines avant l'accouplement, contre 70 jours pour les rats mâles. L'exposition avait été prolongée jusqu'à
19 jours après fécondation pour les femelles gestantes. Après leur naissance, les ratons avaient été exposés sur une durée de 5 à 19 jours. L'étude ne reportait aucune différence statistique entre les performances reproductives des rats traités et des rats contrôles. Il n'y avait pas de différence dans le nombre de ratons vivants par portée, le nombre de ratons par portée et dans le temps de gestation. Le développement des ratons n'est pas affecté par l'exposition au H₂S. L'étude suggérait donc qu'il n'existait pas d'effet du H₂S sur le reproduction et le développement lorsqu'il est en excès dans le milieu (Dorman et al., 2000). Par ailleurs, l'étude de Hemmiki et Niemi (1982) a été remise en cause dans la mesure où la cohorte de sujets pouvait avoir été soumise à d'autres polluants que le H₂S, ce qui aurait biaisé l'étude.

Néanmoins, d'autres études chez les murins ont suggéré des rôles physiologiques pour CBS et CSE dans les organes de reproduction (Zhu et al., 2011). Les souris nullizygotes pour CBS montrent des défauts de reproduction (Liang et al., 2006), avec une diminution de la masse utérine, sans anomalie ovarienne (Guzmán et al., 2006). Toutefois, l'invalidation de CBS génère une diminution du nombre de follicules (Guzmán et al., 2006) et l'inhibition de la maturation ovocytaire (Liang et al., 2007). Il est à noter que, pourtant, CBS n'avait pas été détectée dans les ovocytes (Liang et al., 2006). Par contre, il semble que CSE ne soit pas impliquée dans les fonctions utérine ou ovarienne puisque les souris knock out pour CSE ne présentent pas d'anomalies de reproduction (Yang et al., 2008). De manière similaire, les souris nullizygotes pour MPST ne semblent pas présenter d'anomalies au niveau des organes et fonctions de reproduction (Nagahara et al., 2013).

4.2.4. Effets sur la progression du cycle cellulaire 4.2.4.1. Effet sur les cellules cancéreuses

Les effets du NaHS, sur la prolifération semblent être principalement dépendants de la concentration utilisée, mais aussi du type cellulaire (Tableau 4).

En effet, le NaHS entraine une augmentation de la prolifération sur des cellules endothéliales RF6/A lorsqu'il est utilisé à des concentrations de 10 et 20 μ mol/L. L'augmentation de la prolifération est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation d'Akt qui évolue au cours du temps pour attendre un pic à 30 minutes et prend fin après 1 h. La stimulation d'Akt passerait par la PI3K puisque cette phosphorylation est abolie en présence de wortmannin et LY 294002, deux inhibiteurs de PI3K (Cai et al., 2007). Cette augmentation de la prolifération est observée dans de nombreux autres types cellulaires : des cellules du cancer du côlon HCT 116 (Cai et al., 2010), des cellules épithéliales intestinales (Deplancke and Gaskins, 2003), des cellules de Cajal (Huang et al., 2010) et des cellules endothéliales HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) (Papapetropoulos et al., 2009). À des concentrations supérieures à 500 μ mol/L, le NaHS entraine une baisse de la viabilité des cellules endothéliales RF6/A.

Dans certaines études, il est démontré que des cellules endothéliales, exposées à l'H₂S à une concentration de 60 et 600 μ M, présentent, une accélération de la croissance cellulaire, une augmentation de la phosphorylation d'Akt, mais aussi un accroissement de la phosphorylation d'ERK 1/2 et de p38 après seulement 5 minutes d'exposition (Papapetropoulos et al., 2009). Cette activation de ERK 1/2 et de p38 est détectée dans différents types cellulaires traités par l'H₂S : cellules épithéliales intestinales et gastriques (Deplancke and Gaskins, 2003; Yonezawa et al., 2007), monocytes (Zhi et al., 2007) et cellules de muscles lisses (Yang et al., 2006). Dans certains cas, il est rapporté une inhibition de la phosphorylation de ces protéines dans les cellules β pancréatiques (Yang et al., 2007) et les neutrophiles (Rinaldi et al., 2006). Cependant,

l'augmentation de la phosphorylation d'Akt n'est pas forcément accompagnée par celle de ERK et p38 (Cai et al., 2007; Huang et al., 2010) ni par une augmentation de la prolifération cellulaire.

Les protéines ERK et p38 font partie de la cascade de phosphorylation dite « voie MAPK », voie de transmission du signal la mieux connue, aboutissant, après une cascade de phosphorylations successives, à la sollicitation de facteurs de transcription capables d'activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'invasion et la migration cellulaire, l'angiogenèse et la survie cellulaire. Les effets de l'H₂S sur ces protéines pourraient donc être à l'origine de ces effets sur la prolifération des cellules. Ces effets seraient également relayés par une augmentation de l'expression de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Deplancke and Gaskins, 2003) et une altération de l'inhibiteur de Cdk P21^{waf1/Cip1} (Cai et al., 2010).

Type cellulaire	Traitement (concentration)	Effet sur le cycle	Arrêt cycle	Effets sur les protéines	Référence
Cellules endothéliales (RF/6A)	10-20µM	Stimule la prolifération cellulaire	Aucune		(Cai et al., 2007)
Cellules endothéliales (UVEC)	6-600 μM	Stimule la prolifération cellulaire	Aucun	↗ phosphorylation Akt, ERK et p38	(Papapetropo ulos, Pyriochou et al. 2009)
Cellules épithéliales (IEC-18)	0,05-5 mM	Stimule la prolifération cellulaire	Aucune	✓ expression c-jun et des protéines voies Ras/MAPK	(Deplancke and Gaskins 2003)
Cellules de cancer du colon (HT-116)	1-1000 μM/L	Stimule la prolifération cellulaire	Aucune		(Cai, Wang et al. 2010)
Cellules de Cajal	1-200 μM	Stimule la prolifération cellulaire	Aucune		(Huang, Li et al. 2010)
Cellules musculaires lisses d'aorte de rat (HASMc)	50-500 μM	Inhibe la prolifération cellulaire	N.R	 ≯ p53, p21, Bax ≯ phosphorylation ERK, p38 > expression Cycline 1 Pas d'effet sur Bcl-2 	(Yang, Wu et al. 2006, Baskar, Sparatore et al. 2008)
HEK-293	Surexpression CSE	Inhibe la prolifération cellulaire	N.R		(Yang, Cao et al. 2004)
Fibroblastes de poumon (MRC- 5, IMR-90 et WI-38)	10-75 μM	Inhibe la prolifération cellulaire	N.R	↗ p53, p21, Bax et cytochrome C Pas d'effet sur Bcl-2	(Baskar, Li et al. 2007)
MCF-7	400 μΜ	Inhibe la prolifération cellulaire	G2/M	Clivage de Parp et de la caspase 9	(Lee, Zhou et al. 2011)
MDA-MB-231	$3.6\pm0.5\;\mu M$	Inhibe la prolifération cellulaire	G0/G1	∖ transcription NF- kB	(Chattopadhy ay, Kodela et al. 2012)

Tableau 4 : Récapitulatif des effets de l'H2S sur différents types cellulaires. N.R = Non renseigné.

Si l'H₂S entraine une augmentation de la prolifération cellulaire, il est aussi capable d'entrainer un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, cet arrêt semble être dépendant du type cellulaire considéré. Une augmentation de la concentration d'H₂S, entraine une augmentation de la population cellulaire en phase G1 dans le cas des fibroblastes de poumon et en phase G2/M pour les cellules MCF7 (Baskar et al., 2007; Lee et al., 2011). Dans les fibroblastes de poumon, cet arrêt dans le cycle est accompagné de la formation de micro noyaux et de l'augmentation de l'expression de ku70 et 80, indicateurs de dommages à l'ADN (Baskar et al., 2007).

Lorsque l'on surexprime l'enzyme CSE dans des cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney), on observe une inhibition de la prolifération cellulaire, de la synthèse d'ADN et une surexpression de P21^{CIP/WAK-1} qui seraient dues à une activation de la voie ERK. Ces effets sont inhibés en présence du chélateur d'H₂S, la méthemoglobine (Yang et al., 2004). On observe la surexpression de p21 et de Bax dans les fibroblastes de poumon ainsi qu'un relargage du cyctochrome C, conséquences de l'activation de p53 (Baskar et al., 2007). Plusieurs études suggèrent ainsi que l'H₂S entrainerait une mort par apoptose suivant la voie intrinsèque et, cela, dans différents types cellulaires (Chattopadhyay et al. 2012). Les effets inhibiteurs du l'hydrogène sulfuré sont majoritairement attribués à l'endommagement de l'ADN, et de fait l'activation du DDR et de p53. L'ensemble de ces observations est récapitulé dans le tableau 4.

Une étude portant sur des biopsies de tumeur de cancer du côlon humain a démontré qu'une augmentation de CBS entraine une augmentation de la production de H₂S dans ces cellules via une étude en immuno-empreinte de ces trois enzymes. Cette augmentation de CBS est retrouvée dans des lignées cellulaires dérivées de cellules cancéreuses (HCT116, HT-29 et LoVo) lorsqu'on les compare à une lignée non maligne de cellules de la muqueuse NCM356. Dans ces cellules, CBS est localisée majoritairement dans la fraction cytosolique de la cellule, mais peut aussi être retrouvée dans les mitochondries. Dans ces cellules, l'utilisation de Sh-RNA dirigés contre CBS ou son inhibition pharmacologique dans les cellules HTC116 entraine une baisse de la migration et de l'invasion de la lignée. Le traitement de souris nude ayant subi une xénogreffe de tumeur de cancer du côlon avec de l'AOAA (Acide AminoOxyAcetique), inhibiteur pharmacologique de CBS, entraine une inhibition de la croissance de la xénogreffe (Szabo et al., 2013). Il semble exister une différence de sensibilité à l'hydrogène sulfuré entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. Des cellules non cancéreuses de poumon IMR90 et WI-38 exposées au GYY4139 et au NaHS ne présentent pas d'augmentation de la mort cellulaire (Lee et al., 2011). L'explication pourrait provenir de l'absence d'enzyme du métabolisme de l'hydrogène sulfuré. En effet, des cellules saines du colon sont immunonégatives pour CSE et CBS (Wallace et al., 2009), à l'inverse de cellules cancéreuses épithéliales du colon HT-116 (Cai et al., 2010). Des études montrent que l'H₂S aurait des effets cytoprotecteur et pro-prolifératif sur des lignées de cellules saines telles que des cardiomyocytes (Shi et al., 2009), des neutrophiles (Rinaldi et al., 2006) et des cellules endothéliales (Cai et al., 2007).

Une étude a analysé les propriétés de quatre donneurs de H_2S (HS-aspirin (salicylic acid derivative), HS-sulindac (indole derivative), HS-ibuprofen, HS- naproxen (arylpropionic acid derivative)) sur onze lignées de cellules cancéreuses humaines de différentes origines tissulaires (colon, pancréas, poumon, prostate, sein, sang) (Chattopadhyay et al., 2012b). De par la différence des réponses que les cellules cancéreuses présentent face à l'hydrogène sulfuré, il parait important d'essayer de comprendre pourquoi certaines lignées sont inhibées en présence de H_2S alors que d'autres présentent une accélération de leur cycle cellulaire.

4.2.4.2. Effets génotoxiques

Les premières études portant sur les effets génotoxiques de l'H₂S ont montré des résultats mitigés. Un test d'Ames effectué sur les souches TA97, TA98 et TA100 de *Salmonella typhimurium* démontre que l'H₂S ne serait pas génotoxique. Lorsque le Na₂S est utilisé sur la souche TA1535, souche sensible aux dommages induits par les radicaux libres, il démontre des effets génotoxiques (Attene-Ramos et al., 2007). Des donneurs d'H₂S tel que le Na₂S sont capables d'entrainer des cassures de l'ADN mis en évidence par un test des comètes sur les noyaux de cellules CHO. L'hydrogène sulfuré entrainerait des dommages génotoxiques directs et indépendants du métabolisme cellulaire. Ces effets génotoxiques seraient dus à la formation de radicaux libres (Attene-Ramos et al., 2007).

Il a été observé une modulation de l'expression des gènes codant pour des protéines des réparations de l'ADN (XRCC6, GTF2H1, TFIIH, Rad51) lorsque des donneurs de H₂S sont utilisés sur les cellules CHO. Parmi ces gènes seuls Rad51 subit une régulation négative. Les autres présentent une augmentation de leur expression. Il existe aussi une modulation des voies impliquées dans la voie ATM et majoritairement p53. Il est cependant à noter que p53 présente une expression diminuée en présence du donneur de H₂S (Attene-ramos et al., 2010).

4.2.5. Modulation de l'activité protéique par S-Sulfhydration

4.2.5.1. S-Sulfhydration

Le mécanisme moléculaire principale de la signalisation de H_2S est la S-Sulfhydration (ou sulfuration) des résidus cystéines. Il s'agit de la conversion d'un groupement thiol (-SH) en groupement persulfide (perthiol, hydrodisulfide –SSH). H_2S ne peut pas directement sulfhydrer un groupement thiol, une oxydation est d'abord nécessaire, soit du groupement thiol lui-même, soit de H_2S . Cette oxydation du groupement thiol donne du disulfide ou de l'acide sulfénique (-SOH). La S-Sulfhydration peut aussi avoir lieu lorsque H_2S est oxydé en polysulfides contenant 2 à 8 atomes de souffre capable de sulfydrer les groupements thiols non oxydés. Il est à noter que le NaHS, un donneur d' H_2S , est capable de former spontanément des polysulfides.

La S-Sulfhydration entraine un changement d'activité protéique qui peut aussi bien être activatrice, qu'inhibitrice. Le changement d'activité des protéines est dû à des différences existantes entre un groupement thiol et un groupement persulfide. Les groupements persulfides sont plus acides et existent de façon majoritaire sous forme de fragments dissociés (anion perthiolate R-SS-). Ces fragments dissociés sont, de même, de meilleurs réducteurs que les thiols.

Tableau 5 : Protéines subissant une S-Sulfhydration et conséquences.KATP - canaux potassiques sensibles à l'ATP, I/R -ischémie / reperfusion, SKCA – smallconductance canaux K+ activés par le calcium, IKCa - conductance intermédiaire descanaux K + activés par le calcium , Kv - sensible à la tension des canaux K + , VEGFR1 - récepteur vasculaire de facteur decroissance de l'endothélium 1 , GAPDH - glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase , Keap1 - Kelch like ECH-associatedprotein 1 , Nrf2 - NFE2 facteur lié 2 , eNOS - NO synthase endothéliale , PKG - protéine kinase G , PTP1B - Protéine tyrosinephosphatase 1B , PERK - kinase du réticulum endoplasmique de type protéine kinase, PTEN - phosphatase et TENsinhomologue, SERCA –réticulum endoplasmique lisse Ca2 + -ATPase , MEK1 - activée par un mitogene de la protéine kinase1 , PARP- 1 - poly (ADP- ribose) polymérase 1 .

		<u> </u>	D/0/
Proteine	Effet sur son activite	Consequence	Reference
Canaux K _{ATP}	7	Vasorelaxation	(Mustafa et al., 2009)
Canaux SK _{CA+} et IK _{Ca}	7	Protège le myocarde, hyperpolarise les cellules endothéliales, vasorelaxation	(Mustafa et al., 2011)
Canaux sensitif au voltage K ⁺ Kv4,3	У	Contraction des cellules du muscle lisse gastrique	(Mustafa et al., 2009; Liu et al., 2014)
Parkin	7	Neuroprotection	(Vandiver et al., 2013)
GAPDH	7	?	(Mustafa et al., 2009)
Actin	7	Augmente la polymérisation	(Mustafa et al., 2009)
NF-kB	7	Baisse de l'apoptose	(Sen et al., 2012)
Keap1	7	Activation de Nrf2	(Yang et al., 2013)
eNOS	7	Augmentation de la production de NO, vasorelaxation	(Altaany et al., 2014)
PKG	7	Vasorelaxation	(Mazza et al., 2013)
PTP1B	7	Augmenation de l'activité PERK, Baisse du stress ER	(Krishnan et al., 2011)
PTEN	7	?	(Greiner et al., 2013)
Phospholamban	У	Activation de SERCA, baisse de la relaxation du myocarde	(Mazza et al., 2013)
MEK1	7	Activation PARP1, augmentation des réparations de l'ADN	(Zhao et al., 2014)
Cdc25	7	Arrêt G2/M cellules cancer du sein	(Viry et al., 2011)

De nombreuses études ont été menées sur la S-Sulfhydration des protéines, l'ensemble de ces études est récapitulé dans le tableau 5. Seul l'exemple des PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) est détaillé ci-dessous.

4.2.5.2. Modulation de l'activité phosphatase par S-Sulfhydration

Les PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) sont une famille des protéines qui régulent de nombreuses voies de signalisation et présentent toutes une cystéine essentielle à leur activité dans leur site catalytique. Les PTPs sont regroupés dans une grande famille, structurellement diversifiée d'enzymes receptor-like et non-transmembranaire qui sont des régulateurs spécifiques de la transduction du signal et qui, en conjonction avec les protéines tyrosine kinases (PTK), exercent un contrôle sur diverses fonctions biologiques. Les membres de la famille PTP se caractérisent par un domaine catalytique très conservé, contenant un motif de signature, [His-Cys (X) 5-Arg (Ser / Thr), où X peut-être n'importe quel acide aminé. La présence d'une cystéine au niveau du site actif est essentielle à l'activité PTP. La modification

covalente de la cystéine du site actif rend l'enzyme inactive. Un nombre considérable de données a révélé que la production de H_2O_2 , en réponse à une variété de facteurs de croissance, d'hormones et de cytokines conduit à l'oxydation et à l'inactivation transitoire de ces PTPs (Tonks, 2005).

PTPB1 est un inhibiteur de l'insuline et de la signalisation de la leptine, et est une cible validée pour une intervention thérapeutique dans le diabète et l'obésité (Tonks, 2003; Cook and Unger, 2002). PTP1B favorise également la tumorigenèse du sein médiée par HER2 (Tonks and Muthuswamy, 2007). HER2 fait partie de la famille HER, famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermiques (ErbB), eux-mêmes impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhérence, la migration ainsi que la différenciation de la cellule. PTP1B régule, avec plusieurs autres tyrosines kinases, les voies de signalisation dépendantes de la phosphorylation, comme la voie RAS (Dubé and Tremblay, 2004). PTP1B est inactivée de façon réversible par H₂S in vitro et in vivo par la S-Sulfhydration de la cystéine 215 de son site actif. La raison de la modification de cette cystéine particulière sans changement des autres cystéines pourrait s'expliquer par le fait qu'elle est présente sous forme thiolate plutôt que sous forme de thiol libre, qui rendrait PTP1B plus sensible aux modifications de type phosphorylation ou S-Sulfhydration (Krishnan et al., 2011). PTPB1 intervient dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique. Le réticulum endoplasmique contrôle le repliement et la modification des protéines nouvellement synthétisées. La quantité de protéines pouvant être prise en charge par le réticulum endoplasmique est directement influencée par l'environnement et le statut de la cellule. Si cette quantité est dépassée, on observe la mise en place d'un stress ER déclenchant 3 voies de signalisation conne sous le nom de UPR (Unfolded protein Response) (Ron and Walter, 2007). Ces voies détectent les protéines dépliées dans le réticulum endoplasmique et envoient un signal dans le noyau et le cytosol. Ainsi la cellule peut modifier la quantité de protéines que le réticulum endoplasmique peut prendre en charge.

PERK appartient à la famille des ARN-dépendante protéines kinase (PKR). La phosphorylation d'un résidu de tyrosine conservé à l'intérieur du domaine catalytique a été impliquée dans l'activation des kinases PKR. La Tyrosine 619 est déphosphorylée par PTPB1, entrainant l'inactivation de PERK. Lors d'un stress ER, celui-ci favorise la production de CSE qui à son





1 h à 30. D'après (Heneberg, 2014).

La phosphatase Cdc25 est une phosphatase à double spécificité qui peut être modifiée par S-Sulfhydration. En effet, il a été suggéré que de nombreux composés organosulfurés, produits par des légumes (*Allium*), utilisent l'inhibition de Cdc25 comme mécanisme d'action majeur. Les composés tétrasulfides produits par l'ail et l'oignon entrainent une inhibition de Cdc25A et C *in vitro* et un arrêt en G2/M lorsqu'ils sont utilisés sur des lignées de cancer du sein (Viry et al., 2011). La cinétique d'inhibition est lente et est maximale après 90 minutes. La régulation de Cdc25 par la balance redox de la cellule est un phénomène bien connu : cette régulation a lieu en plusieurs étapes, dont une étape d'altération directe d'une cystéine du site actif (Rudolph, 2005). De nombreux composés soufrés sont capables d'inhiber les Cdc25 (Figure 22), cependant, il n'existe aucune preuve directe de S-Sulfhydration de cette cystéine en particulier. Mais, puisque celle-ci est la cible des ROS et de S-Nitrosylation, il est probable qu'elle puisse être S-sulfhydrée (Heneberg, 2014).

4.3.Le monoxyde d'azote

4.3.1. Généralités

Le monoxyde d'azote (NO) fut le premier gazotransmetteur caractérisé en tant que tel. Cette molécule de signalisation intra- et intercellulaire est impliquée dans divers processus. Radical libre, endogène et ubiquitaire, le NO diffuse au travers des membranes. Ce gaz est incolore, inodore et soluble dans l'eau.

4.3.2. Biosynthèse et catabolisme

Le NO est produit par 3 enzymes : (1) nNOS (neural NO synthase ou NOS de type 1 ou NOS-1) présente au niveau neuronal, (2) une forme dont la synthèse est induite par de nombreux stimuli, la iNOS (inducible NO synthase ou NOS II ou NOS-2) et (3) l'eNOS qui est une NOS endothéliale (endothelial NO synthase ou NOS-3 ou NOS III) (Bredt, 2003). Ces enzymes produisent le NO à partir de l'arginine et sont extrêmement régulées. Ces enzymes peuvent être classées de différentes manières :

- Inductible (NOS 2) ou constitutive (NOS 1/3)
- Dépendante du calcium (NOS 1/3) ou indépendante (2)
- Cytosolique (1/2) ou intra-particulaire (3).

Néanmoins, cette catégorisation s'estompe avec le temps. En effet, la NOS inductible a été découverte comme étant produite de manière constitutive au niveau de l'épithélium respiratoire. Les cellules épithéliales bronchiques et nasales expriment en permanence la NOS inductible. Cette expression continue pourrait être expliquée par une exposition permanente aux aérocontaminants ou différents stimuli pro-inflammatoires (Guo et al., 1995). De même, des études d'immuno-histochimie ont mis en évidence la présence des trois isoformes dans le cytosol ou liées à la membrane. Les trois NO synthases sont apparentées à la famille des cytochromes P450 et encodées par trois gènes distincts (chromosomes 12, 17 et 7) (Tableau 6) (Nathan and Xie, 1994).

NO synthase	Structure du gène	Chromosome	Nombre d'acides aminés, masse moléculaire		
nNOS (NOS-1)	29 exons, 28 introns	12q24.2- 12q24.3 du chromosome 12	1434 aa, 161 Kda		
iNOS (NOS-2)	26 exons, 28 introns	17cen-q11.2 du chromosome 17	1153 aa, 131 Kda		
eNOS (NOS-3)	26 exons, 25 introns	7q35-7q36 du chromosome 7	1203 aa, 133 Kda		

Tableau 6 : Gènes encodant les isoformes de NO synthases.

Ces enzymes sont phosphorylées par de nombreuses sérine kinases afin d'être régulées. Toutes ces enzymes ont en commun :

- un même substrat, la L-arginine
- des mêmes cofacteurs :

- o β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH)
- o tétrahydrobioptérine (BH4)
- o flavine adénine dinucléotide (FAD)
- o flavine mononucléotide (FMN)
- hème (protoporphyrine IX de fer)
- une structure générale.



Figure 23 : Schéma simplifié du métabolisme du NO. Le NO est produit *via* des NO synthases constitutives ou inductibles à partir de L-Arginine, O_2^- et d'électrons provenant du NAPDH (β -nicotinamide adénine dinucléotide). La production du NO génère la formation de L-Citrulline.

La L-arginine est un acide aminé semi-essentiel c'est-à-dire qu'elle est indispensable en période de croissance. Elle est synthétisée essentiellement au niveau rénal à partir de la citrulline, ellemême issue du métabolisme intestinal de la glutamine (Figure 23).

Sous leurs formes actives, les NOS présentent une structure tétramérique : deux monomères de NO synthase associés à 2 calmodulines (CaM). Les NOS présentent deux domaines importants : un domaine N-terminal ayant une activité oxygénase et un domaine C-terminal avec une activité réductase. Ils sont reliés entre eux par un site central où se lie la calmoduline (Crane et al., 1999). Après liaison de la calmoduline, et dans le cas de NOS 1 et 3, un transfert d'électron intra-enzymatique est amorcé par les co-facteurs NADPH, FMN et FAD du domaine réductase vers le groupement hème du domaine oxydase. Puis, en présence de la tétrahydrobioptérene (BH4) et d'oxygène, les NOS catalysent la conversion de la L-arginine en citrulline avec libération de NO et éventuellement d'anion nytoxyl (NO⁻). D'autres espèces de l'azote peuvent être formées comme produits du NO en réaction avec l'anion superoxyde : les ERN tel que le peroxynitrite (ONOO-) ou les dérivés nitrosothiols (Nathan and Xie, 1994).

Le NO est une molécule qui, dans l'organisme, est transformée spontanément, en raison de la présence d'oxygène, en nitrite NO₂. Au contact de l'hémoglobine (HbO₂), le NO est oxydé en nitrate NO₃.

4.3.3. S-Nitrosylation

À l'image du H₂S et de sa capacité à S-Sulfhydrer les protéines, le NO agit par S-Nitrosylation. La S-Nitrosylation des protéines est définie par l'addition covalente et réversible d'un NO au groupement thiol d'une cystéine. La S-Nitrosylation influence les activités enzymatiques, la localisation cellulaire, la stabilité et les interactions protéiques (Anand and Stamler, 2012). La S-Nitrosylation affecte un grand nombre de protéines, à tel point que les NOS sont aujourd'hui considérées comme des « Nitrosothiol synthases » (Hess et al., 2005) avec d'autres enzymes répertoriées dans le tableau 7. Le NO, par le biais des espèces dérivées du NO tel que N₂O₃, peut réagir avec les groupements thiol de la cystéine afin de produire des S-nitrosothiols. De même, les S-nitrosothiols peuvent transférer un groupement NO au thiol d'une cystéine, ce phénomène est appelé transnitrosylation (Hess et al., 2005).

Comme vu précédemment, ce phénomène est réversible et les voies majeurs de dénitrosylation sont les systèmes thioredoxin et GSNOR (S-nitrosoglutathione réductase) (Benhar et al., 2009).

Enzyme	Substrats	Action / Produit			
Ceruloplasmine	Glutathione Glycipan-1	GSNO SNO-glycipan-1			
Superoxide dismutase	Haemoglobin	Hb[β-Cys93-NO]			
Hémoglobine-FeNO	Auto-nitrosylation	Hb[β-Cys93-NO]			
Thioredoxin/thioredoxin réductase	SNO-protein (NO-synthase, PKC ?) GSNO	Dé-nytrosilation Dé-nytrosilation			
GSNO-réductase	GSNO	Régulation de l'équilibre GSNO / protéine SNO			
NOS	NOS (auto S-Nitrosylation) S-Nitrosylation de multiples substats	Inhibition de la production de NO Régulation de la fonction, de la localisation et des interactions			
		protéine / protéine.			

Tobleon 7.	Activitác	onamotica	in implie	mána dona	lo S Nitroo	vlation / I	Nutrosilation
Tapleau / :	Activities	enzymauqu	aes implic	juees dans	la 5-millos	ylation / 1	Je-inytrosnation.

Au cours des dernières années, l'utilisation de méthodes permettant d'étudier la S-Nitrosylation d'un protéasome complet tel que biotin-switch, consistant à remplacer les S-Nitrosylations par des biotinylations spécifiques, ont mis en lumière plus d'une centaine de substrats. Des recherches récentes indiquent que la S-Nitrosylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui est régulée précisément dans le temps et l'espace (Broillet, 1999). Parmi ces protéines, sont recensées des protéines du cytosquelette, des protéines impliquées dans le mouvement cellulaire, le cycle cellulaire, à actions anti-apoptotiques, la synthèse protéique, impliquées dans l'énergie cellulaire, la transcription, ainsi que des transporteurs... (Lefièvre et al., 2007; Stroissnigg et al., 2007; Gao et al., 2005; Martínez-Ruiz and Lamas, 2004; Grau et al., 2013). Du fait du grand nombre de cibles et de processus dans lesquels la S-Nitrosylation est impliquée, il est difficile de faire un état des lieux complet des protéines S-nitrosylées. Nous nous intéresserons donc aux processus les mieux décrits à ce jour dans la littérature.

4.3.4. Effets tissulaires

Le monoxyde d'azote intervient dans de nombreux processus physiologiques. Dans un premier temps, il a été décrit comme le médiateur de deux processus : (1) régulateur de la pression sanguine *via* la relaxation des muscles lisses et l'inhibition de l'agrégation des plaquettes (Murad, 2006) et (2) activateur des macrophages (Bogdan, 2001). Il est aussi décrit en tant que neurotransmetteur dans le système nerveux central, où il affecte l'expression des gènes au

niveau de la transcription et de la traduction, et régule la survie ainsi que la prolifération de divers types cellulaires (muscle lisse (Garg and Hassid, 1990), endothélium (Heller, 1999; Ziche et al., 1997; Yang et al., 1994), kératynocytes (Krischel et al., 1998) adipocytes (Nisoli et al., 1998), cellules nerveuses (Garg et al., 1992; Cheng et al., 2003)). Il joue aussi un rôle dans la croissance, la survie, la prolifération et la différenciation, mais aussi dans des cadres pathologiques (cancer, diabète et maladies neuro-dégénératives) (Davis et al., 2001). Il est impliqué dans le contrôle des fonctions cardiaques et le développement du cœur (Bloch et al., 1999; Murad, 2006). Il jouerait un rôle important dans la régulation de la réponse à l'hypoxie (Brown and Cooper, 1994; Mateo et al., 2003; Almeida et al., 2004).

Du fait des nombreux processus physiologiques régulés par le NO, les plus documentés dans la littérature sont abordés ci-dessous.

4.3.4.1. Régulation du système immunitaire

À l'origine, le NO a été identifié comme le produit de macrophages activés par les cytokines et il lui fut attribué une fonction anti-tumorale et anti-bactérienne *in vitro* et *in vivo*. (Nathan, 1992). Depuis, d'autres cellules du système immunitaires ont été décrites comme capables de produire du NO. Par exemple, les différentes isoformes des NOS sont présentes dans les phagocytes (Weinberg et al., 1995), les cellules dendritiques (Lu et al., 1996), les cellules NK (Bhaumik et al., 2000) et les lignées de lymphocytes T et B (Jiménez et al., 2001; Williams et al., 1998; Mori et al., 1999).

Le NO présente une activité antimicrobienne. En effet, le NO est capable de tuer et de réduire la réplication d'agents infectieux (virus, bactéries, protozoaires, champignons, helminthes ...) cela par un effet direct du NO sur le pathogène ou en entrainant l'activation du système immunitaire par le biais de la voie NOS (De Groote and Fang, 1995). Cette activité antimicrobienne peut être observée aussi bien au niveau du cytosol que dans le compartiment endosomal des macrophages (Nathan, 1992). Elle est due, d'une part, à la formation de résidus du NO produit par la réaction du ·NO avec O₂- généré par la NAPDH oxydase de la cellule hôte ou produit dans le pathogène lui-même. D'autre part, la mort des parasites induite par les macrophages, dépendant d'iNOS peut aussi être la conséquence d'une déplétion en arginine. En effet, l'arginine est requise pour la synthèse de polyamine et d'ADN dans de nombreux parasites (Olds et al., 1980; Eckmann et al., 2000; Piacenza et al., 2001). La présence de NOS₂ dans des macrophages Mac-1, F4/80 et MOMA-2⁺ est associée avec la disparition de *Leishmania major* (responsable de la leishmaniose) (Stenger et al., 1994). Si la présence de NO empêche le développement microbien, l'utilisation d'inhibiteur des NOS exacerbe les infections (MacMicking et al., 1997; Karupiah et al., 1993; Stenger et al., 1996).

Le NO inhibe l'adhérence des plaquettes et des leucocytes à l'endothélium. Cela a été montré par l'utilisation de donneurs de NO sur des monocouches de cellules endothéliales en chambre d'écoulement qui empêche le roulement, l'adhérence et la transmigration des leucocytes (monocytes et granulocytes) (Grisham et al., 1998). Dans le système vasculaire de souris naïves, le roulement des leucocytes et leur adhérence sont principalement contrôlés par le NO produit par eNOS et nNOS. Pendant les réponses inflammatoires, le recrutement des leucocytes et l'adhérence sont également régulés par iNOS (Lefer et al., 1999; Hickey et al., 1997).

Cependant, les mécanismes impliqués dans ce processus ne sont pas encore bien connus. Il a déjà été démontré que le NO régule négativement l'expression endothéliale de membres de différentes familles de molécules d'adhérence, telles que VCAM-1, ICAM- 1, une E-sélectine la CD62E et une P-sélectine la CD62P, mais l'étendue de la modulation est très variable (Spiecker et al., 1998; Lefer et al., 1999).

4.3.4.2. Effets sur l'hypoxie

L'hypoxie est décrite comme un état pathologique d'un organisme dans lequel il existe un déséquilibre entre l'apport et la demande en oxygène. Ce phénomène peut aussi bien affecter l'organisme dans son intégralité que dans une zone précise, ce dernier cas se référant à une hypoxie tissulaire. Il est à noter que l'hypoxie peut avoir lieu en absence d'hypoxia, qui traduit une baisse de la concentration d'oxygène dans le sang. L'oxygène participe à la chaine respiratoire qui permettra la production d'ATP, et donc la source de l'énergie cellulaire. Ainsi l'hypoxie entraine une réduction globale de la synthèse protéique.



Figure 24 : Contrôle de dégradation de HIF- α **par le NO.** pVHL est essentiel pour l'ubiquitination et la dégradation rapide de HIF- α . L'hydroxylation post-traductionnelle de résidus de proline dans le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) de HIF- α est nécessaire pour l'interaction entre HIF- α et pVHL. pVHL est une cible de S-Nitrosylation. HIF- α et pVHL ne parviennent alors plus à interagir, et la dégradation de HIF- α est inhibée. Par conséquent, même en présence d'oxygène, les cellules perçoivent un stimulus hypoxique. Ub , l'ubiquitine. D'après (Hess et al., 2005)

De nombreux gènes sont activés en réponse à l'hypoxie. Parmi eux se trouve un facteur de transcription hétèrodimerique, l'HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Wang et al., 1995). L'HIF se compose de deux sous-unités : HIF- α qui est inductible par l'hypoxie et une HIF- β exprimée

constitutivement. L'HIF est considéré comme un régulateur majeur de l'homéostasie de l'oxygène, et dans des conditions hypoxiques, l'HIF- α est accumulé et subit une translocation dans le noyau où il se dimérise avec l'HIF- β et se lie à des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE; séquence consensus 5'-(R) CGTG-3') situés dans les régions régulatrices du promoteur des gènes cibles (Semenza, 2012). Ces gènes cibles permettent d'optimiser l'acheminement de O₂ aux tissus et d'optimiser le métabolisme cellulaire.

En condition de normoxie (état du corps pour lequel le dioxygène en concentration normale dans le sang permet une activité normale du corps), la présence d'oxygène entraine l'hydroxylation d'un résidu proline de la sous-unité HIF- α . Cette sous-unité est alors reconnue par la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), une E3 ligase. Cette liaison entraine la poly-ubiquitinilation de la protéine et sa dégradation par le protéasome. Dans le cadre de l'hypoxie, l'absence d'oxygène empêche l'hydroxylation de l'HIF- α et donc sa dégradation par le protéasome (Jeffrey Man et al., 2014) (Figure 24).

Le NO peut intervenir dans ce système par la S-Nitrosylation soit de HIF- α , soit de pVHL. Cette S-Nitrosylation empêche la liaison de pVHL sur la sous-unité et celle-ci échappe donc à sa dégradation. HIF- α subit la S-Nitrosylation sur sa cystéine 533 chez les souris (analogue à la Cystéine 520 de l'Homme) (Li et al., 2007) alors que la S-Nitrosylation de pVHL a lieu sur la Cystéine 162 (Carver et al., 2007).

4.3.5. Effet sur le cycle cellulaire, la croissance et la mort cellulaire

Les mécanismes par lesquels le NO entraine un arrêt dans le cycle cellulaire sont connus dans certains cas. Le monoxyde d'azote semble principalement capable d'induire un arrêt durant la transition G1/S du cycle cellulaire. Plusieurs études ont montré que, dans les cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC), les effets sur la prolifération cellulaire résultent de l'inhibition du complexe Cdk 2/Cycline A, Cdk2 étant l'enzyme clé de la transition G1/S. (Guo, Andres et al. 1998, Sharma, Tan et al. 1999). Les donneurs de NO empêchent l'activation de la kinase Cdk2 sans altérer son expression. Parallèlement, ils bloquent l'expression de la cycline A en réprimant son promoteur (Guo, Andres et al. 1998). D'autres études ont démontré que le SNAP, un donneur de NO, inhibait cdk2 en induisant l'expression de p21^{sdi1/Cip/Waf1}, un inhibiteur de Cdk. (Ishida, Sasaguri et al. 1997, Tanner, Meier et al. 2000).

Si les études portant sur les VSMC sont les plus nombreuses, d'autres articles traitent des effets du NO sur d'autres lignées cellulaires. Par exemple, il a été observé que sur les MDA-MB-231, une lignée de cellules du cancer du sein, l'utilisation d'un donneur de NO entrainait un arrêt en phase G1 qui serait dû à l'inhibition de l'expression de la cycline D1 et une hyperphosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Pervin, Singh et al. 2001).

La régression des tumeurs peut aussi être le résultat de l'induction du iNOS dans les cellules tumorales en réponse à l'IFN- γ et au TNF produits par les lymphocytes cytotoxiques (Kwak et al., 2000). *In vivo*, la production de NO et de superoxyde dans les cellules T CD4 par les phagocytes (macrophages et éosinophiles) est nécessaire pour l'immunité systémique antitumorale. La déplétion du gène iNOS, permettant la production de NO par ces cellules immunitaires, entraine une baisse de la suppression tumorale (Dinapoli et al., 1996; Hung et al., 1998). La surproduction de NO par les cellules de mélanome ou de sarcome induite suite à la transfection du gène iNOS ou sa surexpression empêche la métastase tumorale et permet une régression de tumeurs *in vivo*. Paradoxalement, iNOS est fréquemment exprimée de manière constitutive dans les cellules tumorales. Elle favorise alors la croissance tumorale, la néovascularisation et le caractère invasif par induction de mutations de p53 et de surexpression du facteur de croissance vasculaire endothélial (review (Bogdan et al., 2000)). De plus, l'exposition des cellules tumorales au NO conduit à une surexpression de la grande sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKcs), qui est nécessaire pour la réparation des cassures d'ADN double brin. L'augmentation de la DNA-PKcs protège les cellules non seulement contre les effets toxiques de NO, mais aussi contre des agents endommageant l'ADN actuellement utilisés pour le traitement des tumeurs (tels que les rayons X, le cisplatine et l'adriamycine) (Xu et al., 2000).



Figure 25: Régulation de l'apoptose via TRX-ASK1. Adapté d'après (Hess et al., 2005)

La mort cellulaire peut aussi être régulée par S-Nitrosylation. Dans le cas de la caspase 3 par exemple, celle-ci peut être S-nitrosylée par les NOS lorsqu'elle se trouve sous forme de zymogène inactif. Cela entraine la formation d'un complexe formé de la pro-caspase-3 nitrosylée, d'acide sphingomyélinase et d'une NOS. Lorsque la procaspase 3 est ainsi séquestrée et S-Nitrosylée, elle ne peut plus être activée par clivage. La dénitrosylation peut être induite par la stimulation apoptotique par la voie Fas, ce qui entraine la dissociation du complexe et ainsi permet l'activation de la caspase 3 (Matsumoto et al., 2003).

La thiorédoxine (TRX), une oxydoréductase, exerce une influence anti-apoptotique en liant et inactivant le signal apoptotique de la kinase-1 (ASK1), et par le maintien de l'équilibre cellulaire redox / S-nitrosothiol (SNO). Les NOS maintiennent l'activité de TRX par la S-Nitrosylation de la Cystéine 69. Cette S-Nitrosylation inhibe l'activité kinase de ASK1. L'activité NOS peut donc propager un effet anti-apoptotique grâce à la S-Nitrosylation de plusieurs éléments des voies de transduction qui sont induite par ASK1 tel que c-Jun N-terminal kinase (JNK) ou p38 mitogen-activated protein kinases (p38). Ainsi, il existe un effet inhibiteur des protéines pro-apoptotiques, y compris, les caspases.

TRX exerce également une influence anti-apoptotique qui est indépendante de ASK1 en piégeant les ROS. Le stress oxydatif entraine la modification de site actif et l'inactivation de la cystéine responsable des effets pro-apoptotiques de TRX. (Sumbayev, 2003; Haendeler et al., 2002) (Figure 25).

4.3.6. Effets du monoxyde d'azote sur la reproduction

Les enzymes responsables du métabolisme du NO sont détectables au niveau des organes reproducteurs et peuvent donc jouer un rôle dans la reproduction. Au niveau des organes reproducteurs femelles, les deux enzymes principalement détectables sont eNOS et iNOS ; cependant, en fonction de l'espère concernée, ces enzymes ne sont pas présentes dans les mêmes tissus (Tableau 8).

Tableau 8 : Récapitulatifs	de la	répartition	des	enzymes	du	métabolisme	du	NO	au	sein	de	différentes	espèces.	N.D. :
Non Déterminé.														

Espèce	eNOS	iNOS	Référence
Rat	Cellules de la granulosa Cellules de la thèque Stroma ovarien	Cellules somatiques folliculaires Cellules lutéales	(Zackrisson et al., 1996; Jablonka-Shariff and Olson, 1998; Nakamura Y., shiro N., Masahiko T., Shuji Y., Yoshiaki T, Hisako S., Norihiro K., 1999; Yamagata et al., 2002)
Souris	Cellules de la thèque Cellules de la granulosa	Cellules de la thèque Cellules de la granulosa	(Mitchell et al., 2004)
Homme	Cellules lutéales Cellules de la granulosa	N.D.	(Van Voorhis et al., 1994)
Bovin	Cellules de la thèque Cellules de la granulosa Epithélium de surface Corpus luteum	Cellules de la granulosa	(Zamberlam et al., 2011; Basini et al., 1998; Khan and Das, 2011; El-Sherry et al., 2013)
Porc	Cellules de la granulosa	Cellules de la granulosa	(Grasselli et al., 2002)

Dans l'ensemble de ces espèces, la concentration en NO est variable au cours de l'ovogenèse et semble être sous le contrôle des gonadotropines (Van Voorhis et al., 1995), la FSH (Follicle Stimulating Hormone), l'IGF-1, l'œstradiol (Zamberlam et al., 2011) et de l'hCG (Pinto et al., 2003).

4.3.6.1. Effet sur la reprise de méiose.

Le NO montre de nombreux effets sur la méiose des vertébrés, principalement sur l'ovogenèse. Il aurait un rôle sur la maturation méiotique de l'ovocyte. Ce rôle serait contrasté en fonction de la concentration. Chez la souris, le NO inhibe ou active la maturation ovocytaire, de façon dose dépendante (Bu et al., 2003). En effet, à faible concentration, le NO transmet des signaux extracellulaires jusqu'à ses cibles intracellulaires afin de réguler la progression méiotique des ovocytes. À l'inverse, à forte concentration, le NO dégrade l'ovocyte par ses dérivés toxiques. Ses deux actions antagonistes résultent de l'activation de différentes voies de signalisation par le NO. Dans ce modèle le NO stimule la reprise de méiose à une concentration de 30 mM alors que son effet inhibiteur est observé à partir de 60 mM (Bu et al., 2003). Dans les ovocytes de porc, la concentration requise pour la maturation est de 0.1 mM alors qu'une plus forte dose de l'ordre de 10 mM est responsable de l'inhibition (Viana et al., 2007).



Figure 26 : Schéma des effets du NO sur la reprise de méiose. Lors de l'administration de LH, les concentrations de NO dans le follicule ovarien chutent. L'activité GUCY1 baisse alors, et entraine la diminution des niveaux de cGMP (Rosselli et al., 1998; Sela-Abramovich et al., 2008; Zamberlam et al., 2014). À son tour cette baisse permet l'activation séquentielle de RAF1, MAP2K1, et MAPK. Au final ces évènements permettent l'inhibition de la cAMP ce qui permet la reprise de la méiose. De plus, la réduction des concentrations de GMPc peut aussi conduire à la suppression de son effet inhibiteur sur PDE3A, augmentant l'efficacité de la dégradation de l'AMPc (Nakamura et al., 2002; Bu et al., 2004; Zhang et al., 2009).

L'effet inhibiteur sur la maturation ovocytaire par le NO peut se faire en modulant la concentration de GMPc (Zhang et al., 2009). Chez le rat, le GMPc est produit par les cellules de la granulosa. Il inhibe l'activité d'hydrolyse de la phosphodiesterase 3 (PDE3), maintenant un niveau stable d'AMPc et donc le blocage de la méiose ovocytaire. Il active aussi les protéines kinases GMPc-dépendantes (PKG) diminuant l'activité MAPK. Le NO dérivé de iNOS semblerait impliqué dans l'augmentation de GMPc dans les follicules pré-ovulatoires chez le rat (Nakamura et al., 2002) et la souris (Bu et al., 2004), ce qui empêche la reprise de méiose des ovocytes. L'effet du NO sur l'activité GMPc serait relayé par l'activation de GUCY1, gène

responsable de l'encodage de la guanylate cyclase (Rosselli et al., 1998; Sela-Abramovich et al., 2008; Zamberlam et al., 2014).

De plus, le NO exercerait ses effets à travers l'inhibition de l'Adénylate Cyclase, l'activation de protéine G, mais aussi de canaux potassiques GMPc-dépendants en améliorant le taux d'échange de nucléotides (Bu et al., 2004). Toutefois, chez la souris, l'effet inhibiteur du donneur de NO, SNAP, n'est pas complètement GMPc-dépendant et des voies de signalisation autres que NO/GMPc/PKG semble être impliquées telles que la voie NO/AMPc/PKA ou la voie calcium dépendante (Bu et al., 2003; Kimura, 2000). Enfin, une étude a montré qu'en permettant la stabilisation du niveau d'AMPc, le NO augmente donc l'activité de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA), ce qui au final inhibe la phosphatase Cdc25B de l'ovocyte et ainsi limite l'activation du M-phase promoting factor (MPF) (Pandey et al., 2010). Schwarz et ses collaborateurs ont très récemment confirmé que la progression de la méiose des ovocytes bovins était bien liée à une inactivation de la voie NO/GMPc/PKG, mais n'ont pas pu faire le lien avec la voie NO/AMPc/PKA dans ce modèle (Schwarz et al., 2014).

La baisse de la production de NO induite par l'augmentation de la LH permettrait de lever l'inhibition induite par la PKA sur les ovocytes et donc la reprise de méioses (Figure26).

4.3.6.2. Autres effets sur l'appareil reproducteur

Le NO n'est pas uniquement impliqué dans la reprise de la méiose des ovocytes. Il intervient dans nombreux processus lié à la fonction de reproduction (Figure 27). Le NO jouerait aussi un rôle dans l'atrésie, phénomène correspondant à un processus sélectif durant la croissance folliculaire qui implique la mort cellulaire par apoptose entrainant la diminution du stock d'ovocytes. Plusieurs études pointent du doigt les effets protecteurs du NO contre l'apoptose dans les ovocytes de rats (Matsumi et al., 1998; Yoon et al., 2002; Chen et al., 2005a). Cet effet a aussi été rapporté sur les cellules de la granulosa humaines (Dineva et al., 2008). Cependant d'autres études ont reporté un effet inducteur de l'apoptose du NO notamment chez les bovins (Dubey et al., 2011; Basini et al., 1998). Ces études laissent à penser que les effets du NO dépendraient de la taille de la cellule. En effet, le NO ne serait pas capable d'entrainer des dommages à l'ADN sur des cellules folliculaires de grandes tailles, celles-ci présentant un système suppresseur d'apoptose en présence de clivage de l'ADN (Sugino et al., 1996).

Le NO jouerait aussi un rôle dans la cascade moléculaire induite par la sécrétion d'hormone LH dans les ovocytes. Il permet dans les modèles rat et lapin d'entrainer une augmentation de la synthèse de prostaglandines en induisant l'expression de PTGS2, une des deux enzymes responsables de la production cette hormone. Ce phénomène a été démontré chez le mouton (Grazul-Bilska et al., 2006), les bovins (Zamberlam et al., 2014) et l'humain (Fang et al., 2015).

Du fait de ses capacités de vasodilatateur, le NO intervient dans les fonctions érectiles du pénis. L'activité de la NOS a été localisée, chez le rat, dans les neurones innervant le corps caverneux du pénis et dans le plexus neuronales de la couche adventice des artères du pénis (Burnett et al., 1992) ainsi que dans l'endothélium du corpus caverneux (Burnett et al., 1996). Chez l'homme, ces NOS peuvent aussi être retrouvée au niveau des neurones du plexus pelvien, des nerfs caverneux et leurs terminaisons terminales dans le tissu érectile corporelle, dans les branches des nerfs dorsaux du pénis et au niveau du plexus nerveux dans l'adventice des artères caverneuses profondes (Burnett et al., 1993). La réduction de l'activité nNOS est corrélée à la baisse de l'activité érectile (Carrier et al., 1997; Ragazzi et al., 1996). La castration est associée à une baisse de l'activité eNOS et nNOS dans le pénis et à une baisse de 70% de l'activité érectile (Lugg et al., 1996; Penson et al., 1996).



Figure 27 : Phénomènes de la reproduction régulés par le NO.

Le NO est présent au niveau des testicules et d'autres organes urogénitaux mâles (urètre, la vessie, la prostate et la vésicule séminale) (Burnett et al., 1995; Ehrén et al., 1994). La synthèse de NO et l'expression d'iNOS a aussi été démontrée dans des cultures de cellules de Sertoli (Stéphan et al., 1995) et dans des ces cellules de Leydig (Tatsumi et al., 1997). Cela suggère que les cellules testiculaires sont équipées d'une voie NO-cGMP et que celle-ci pourrait jouer un rôle dans régulation des fonctions testiculaires telles que la spermatogenèse et la stéroidogenèse. L'enzyme eNOS est exprimée dans les cellules de Sertoli et de Leydig à tous les stades de la spermatogenèse. L'activité eNOS est cependant absente dans les cellules germinales normales, mais présent dans les cellules dégénérées ou apoptotiques. Une forte expression d'eNOS a également été observée dans les spermatocytes et les spermatides, suggérant un rôle d'eNOS dans la spermatogenèse et la dégénérescence des cellules germinales (Zini et al., 1996).

Le NO régule aussi la mobilité spermatique de façon dépendante de la dose. Une faible concentration de NO augmente la mobilité en neutralisant les radicaux libres inhibiteurs de la mobilité (Hellstrom et al., 1994) alors qu'une moyenne ou forte concentration la diminue en contribuant à la formation de composés toxiques pour les spermatozoïdes tels que le péroxynitrite (Rosselli et al., 1995).

4.3.6.3. Effet sur la fécondation et l'activation.

La réponse de l'ovocyte à l'acrosome du spermatozoïde se fait notamment par une libération de NO, engendrant la synthèse de GMPc suivie de l'activation de PKG puis de l'œuf de souris (Bu et al., 2004). Toutefois, chez la souris les spermatozoïdes induisent une forte réponse calcique de l'ovocyte sans affecter le niveau de NO, qui ne semble donc pas être un facteur clé dans la fécondation.

Cependant une étude datant de 2000 semble indiquer que le NO n'aurait aucun rôle dans la fécondation. Dans l'ovocyte d'oursin le NO à, de la même manière que pour la souris, était suggéré comme étant responsable de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire responsable de l'activation de l'ovocyte (Kuo et al., 2000). Dans l'étude de 2001, portant aussi bien sur la souris que sur l'oursin, l'augmentation de Ca^{2+} engendrée par le sperme n'a pu être corrélée avec une augmentation du NO intracellulaire. De la même manière un inhibiteur de la synthèse de NO (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester) n'a aucun effet sur cette augmentation de calcium (Hyslop et al., 2001).

Chez le porc, un donneur de NO agirait comme activateur parthénogénétique de l'ovocyte (Petr et al., 2005). Dans cette étude les auteurs se sont intéressés aux effets du SNAP et du SNP, deux donneurs de NO, et de la micro-injection d'une eNOS exogène sur l'activation des ovocytes de porc. Les donneurs de NO sont capables d'induire l'activation des ovocytes dépendamment de la dose. Il est à noter que le SNAP, donneur fort de NO, est plus efficace que le SNP. La microinjection de l'eNOS exogène seule n'est pas capable d'induire une activation des ovocytes. Cependant, son injection en présence de calmoduline permet l'activation d'une façon dépendante de la dose. La spécificité de ces effets a été testée par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des NO synthases : le L-NAME, qui a permis le blocage de l'activation des ovocytes après micro-injection de l'eNOS couplée à la calmoduline ou en présence des donneurs de NO. Ce dernier résultat est plutôt surprenant puisque l'action des donneurs de NO ne dépend pas d'une NO synthase et le L-NAME ne devrait donc pas être capable d'influencer leur action sur l'ovocyte. Ainsi, plus que le NO en lui-même, ce serait en réalité l'activité des NO synthases qui serait responsable de l'activation des ovocytes. En présence de SNAP, aucune exocytose des granules corticaux n'est visible, et cela même après 10h, ce phénomène se produisant normalement 6h après la pénétration du spermatozoïde. Cependant, il est connu que l'activation des ovocytes induite artificiellement n'entraine pas toujours l'exocytose des granules corticaux. De même, l'activation et l'exocytose des granules corticaux ont été démontrées comme étant des processus différents (Sun et al., 1997). Un autre problème se pose cependant : la cinétique d'activation des ovocytes en présence de donneurs de NO est très longue, demandant environ une dizaine d'heures, alors que le phénomène d'activation est normalement un processus rapide, de quelques minutes. Un autre activateur des ovocytes est connu pour entrainer ce phénomène selon une cinétique longue : l'acide cyclopiazonique, qui entraine une augmentation du calcium intracellulaire par une inhibition ATPases calcium-dependant (Petr et al., 2000). À l'ensemble de ces observations doit être ajouté un mauvais clivage des premiers stades embryonnaires de ces ovocytes activés par le NO. Du fait de l'activation très lente, de l'absence d'exocytose de granule corticaux et d'un mauvais taux de division post activation il reste encore à démontrer que le NO joue effectivement un rôle dans l'activation des ovocytes de porcs (Petr et al., 2005).

Chez le xénope, il est admis que le blocage en métaphase II et l'inhibition de la terminaison de la méiose sont dus au maintien de l'activité du MPF . Une augmentation de la concentration calcique intracellulaire active la protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante (CaMKII), une protéine clé sous-régulant le MPF en activant l'Anaphase Promoting Complex (ou APC). L'utilisation d'un donneur de NO, le SNAP, induit l'exocytose des granules corticaux et la sortie du blocage en métaphase II par des voies calcium dépendantes (Jeseta et al., 2012). Sur le plan moléculaire, le SNAP entraine une augmentation de calcium, induit l'inactivation de MAPK, mais le MPF reste actif (Jeseta et al., 2012).

RÉSULTATS

Effet du NaHS sur la reprise de méiose et le développement précoce du xénope

Publication 1: Hydrogen sulfide modulates cell cycle transition during *Xenopus* meiosis and early development

Gelaude A¹, Marin M¹, Cailliau K¹, Lescuyer-Rousseau A¹, Martoriati A¹, Bodart JF¹.

(Article en préparation)

¹Université Lillel, Sciences et Technologies, Régulation des Signaux de Division Team, UMR 8576 CNRS, FR3688 CNRS, Villeneuve dAscq, France.

1. Contexte

Si les effets du monoxyde d'azote sur la méiose sont de plus en plus décrits (Jeseta et al., 2012; Gelaude et al., 2015; Nakamura et al., 2002; Jablonka-Shariff and Olson, 1998), les effets induits par l'hydrogène sulfuré (H₂S) demeurent méconnus. Pourtant, le H₂S est également produit au niveau des organes reproducteurs mâles comme femelles (Liang et al., 2006, 2007; Kimura, 2011) et l'importance que revêtent les enzymes responsables de son métabolisme dans ces tissus commence à être démontrée, notamment au niveau des fonctions de reproduction chez le rat (Ghasemi et al., 2012), la souris (Guzmán et al., 2006; Liang et al., 2006) et le lapin (Srilatha et al., 2009). Cependant, l'ensemble de la bibliographie portant sur ce domaine d'étude reste limité et le rôle du H2S, ainsi que les mécanismes mis en jeu, pour son action sur les organes reproducteurs, ne sont pas encore clairs.

2. Objectifs

Au vu du peu de données expérimentales, et dans le cadre d'une comparaison avec le modèle méiotique de l'ovocyte de porc (voir publications 3 & 4, section suivante), nous nous sommes fixés comme objectifs d'étudier plus précisément les effets de l'H₂S sur les voies de signalisation impliquées dans la levée du blocage des ovocytes en prophase I, ainsi que ses effets sur la fécondation et le développement précoce des embryons de xénope.

3. Effets du NaHS sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope.

3.1.Choix du donneur de H2S

Deux donneurs de H_2S ont été choisis dans le cadre de cette étude. Le premier, le NaHS, est un donneur rapide de H_2S , libérant une grande quantité de H_2S en une heure pour ensuite ne plus en produire. À l'inverse le GYY4137 est un donneur lent de H_2S , libérant une faible quantité de H2S, mais sur un temps pouvant aller jusqu'à plusieurs jours.

Un autre donneur de H₂S rapide est souvent cité dans la littérature : le Na₂S. Ce donneur de H₂S est notamment utilisé pour les études portant sur les effets du H₂S sur la reprise de méiose et l'expansion du cumulus des ovocytes de porc (Nevoral et al., 2014). Le NaHS a été choisi dans notre étude car sa capacité de production en H₂S était supérieure à celle produite par le Na₂S pour des concentrations de 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M et 1600 μ M après une durée de 30 minutes (Figure 28).



Figure 28 : Comparaison de la production de H₂S produit par le NaHS et le Na₂S. La libération d'H₂S par notre donneur le NaHS a été vérifiée à l'aide d'un test colorimétrique décrit par Pan et al. en 2006. Le donneur d'H₂S est mis en présence de pyridoxal-5-phosphatase, de L-cystein et de zinc acétate. La réaction est stoppée après une heure à l'aide d'acide trichloroacétique. Afin de colorer la réaction du N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine sulphate et du FeCl3 sont ajoutés. Un complexe de couleur jaune est alors formé et la DO mesurée à 670 nm permet de déterminer la quantité de H₂S produit.

La comparaison avec le donneur lent qu'est le GYY4137 sera détaillée plus tard dans les résultats supplémentaires.

3.2.Le NaHS entraine une inhibition dose-dépendante de la reprise de méiose induite par la progestérone.

Le NaHS, donneur d'H₂S, provoque un ralentissement, voire une inhibition non complète à forte dose, de la reprise de méiose induite par la progestérone (Article 1, Figure 1.A et B.). Lorsque les ovocytes de ces expériences sont séparés en deux groupes, en fonction de la présence ou non d'une tache de maturation, les profils observés en immuno-empreinte (phosphorylation de MAPKs, ERK et RSK : activation de la voie MAPK ; phosphorylation de 15tyr-Cdc2 et Histone H3 : activation du MPF), sont cohérents. En effet, les ovocytes ayant repris leur méiose (avec tache de maturation) présentent une voie MAPK et un MPF actifs. Au contraire, les ovocytes sans tache de maturation ne montrent aucune activation de ces deux voies. Ces observations contrastent avec l'hétérogénéité des résultats observés dans les ovocytes traités au NaHS, puis colorés au rouge nucléaire et au picroindigo carmin, ne présentent aucune altération de morphogenèse du fuseau de méiose (Data not show).

Puisque le H₂S perturbe l'activation des voies MPF et MAPK de manière dépendante de la dose, nous avons testé la capacité de ce gazotransmetteur à inhiber les évènements précoces qui suivent la stimulation par la progestérone. Trois étapes majeures de la reprise de méiose ont été choisies, reposant sur trois évènements majeurs de la reprise de méiose : (1) l'inhibition de la PKA, (2) l'inhibition de la synthèse protéique et (3) l'inhibition de la boucle d'autoamplification du MPF. Ces évènements biochimiques initiaux de la reprise de méiose ont été simplifiés comme présentés dans la figure 29. L'effet du NaHS sur chacun de ces évènements biochimiques clés a été testé.



Figure 29 : Schéma des voies biochimiques impliquées dans la reprise de méiose des ovocytes de xénope et mécanismes potentiellement sensibles aux NaHS. La liaison de la progestérone sur son récepteur entraine (I) la baisse de l'activité PKA permettant (II) une augmentation de la synthèse protéique et (III) l'activation du Cdc25c. Mos est synthétisée et permet l'activation de la voie MAPK par des phosphorylations successives. Le dernier effecteur de cette voie combiné à la synthèse protéique est l'activation de Cdc25c qui permet lui-même l'activation du pré-MPF stocké dans l'ovocyte. Le H2S pourrait entrainer une inhibition de la reprise de méiose par un effet sur ces différents évènements biochimiques.

3.3.Les effets du NaHS ne sont pas dus à une augmentation de l'activité PKA

Le NaHS à des concentrations entre 1 μ M et 100 μ M est capable de provoquer une augmentation d'AMPc dans les ovocytes de xénope et les cultures primaires de cellules du cerveau tel que des lignées cellulaires gliales et neuronales (H Kimura, 2000). En présence de NaHS à 100 μ M l'accumulation d'AMPc observée dans les ovocytes de xénope atteint jusqu'à \approx 70 pmol/mL contre 25 pmol/mL en ovocytes contrôles. Une première hypothèse, selon laquelle le H2S pourrait inhiber la transition G2/M *via* une augmentation de l'activité PKA, a été posée. Cette hypothèse a été testée en utilisant un inhibiteur de l'activité PKA : le H-89. Le H-89 entraine une inhibition de l'action de la PKA par le biais d'une inhibition compétitive avec l'ATP pour la fixation sur le site catalytique. À l'inverse du KT5720 par exemple, dont l'action inhibitrice est similaire à celle de l'H-89, il n'est pas perméable aux membranes et doit donc être micro-injecté dans l'ovocyte pour y effectuer son action. La micro-injection de H-89 à une concentration en excès de 50 μ M ne permet pas d'empêcher les effets inhibiteurs de NaHS sur la reprise de méiose (Article 1, Figure 2). Bien que cette augmentation d'activité de PKA en présence de H2S soit avérée, elle n'est certainement pas suffisante pour contrecarrer la baisse entrainée par la fixation de la progestérone sur son récepteur.

3.4.Le NaHS est capable d'entrainer une inhibition de la synthèse protéique.

Les ovocytes de Xenopus sont capables de traduire l'ARN ou de l'ADN injecté dans leur cytoplasme, mais également, dans certains cas, d'effectuer des modifications post-traductionnelles nécessaires pour l'activité de la protéine (Sigel, 1990). Parce que les ovocytes de xénope ne synthétisent pas de manière endogène la protéine Myc, cette protéine a été choisie et utilisée comme étiquette afin d'étudier l'effet de NaHS sur la synthèse protéique. Un ARNm Myt1-Myc a ainsi été injecté dans des ovocytes préincubés durant 15 minutes dans du NaHS à différentes concentrations. La quantité de protéine Myt1-Myc traduite a été mesurée après 8 heures par immuno-empreinte en utilisant un anticorps spécifique de Myc.

Les résultats montrent une baisse dans la quantité de protéine Myt-Myc traduite dans les ovocytes de xénope de façon dépendante de la dose de NaHS. Plus la concentration en NaHS est forte plus la traduction semble inhibée (Article 1, Figure 4). C'est la première fois qu'un potentiel effet de l'H2S sur la traduction des protéines est montré.

3.5.Le NaHS empêche la reprise de méiose principalement par un mécanisme ROSdépendant et l'inhibition de Cdc25c.

Des expériences de micro-injection de cytoplasmes d'ovocytes matures de xénope en ovocytes immatures ont révélé que de fortes concentrations de NaHS (1 mM et 5 mM) étaient capables d'entrainer une inhibition totale de la reprise de méiose des ovocytes. Aucune tache de maturation n'est visible sur les ovocytes traités avec le donneur de H₂S; l'immuno-empreinte de Cdc2 révèle un profil d'ovocytes bloqués en prophase I et l'hémisection de ces ovocytes après fixation par la chaleur montre la présence d'une vésicule germinative (Figure 5.A et B.). Ces expériences de micro-injection permettent d'étudier les effets d'un composé sur la mise en place de la boucle d'auto-amplification du MPF, boucle dont les composants majeurs sont le MPF et la phosphatase Cdc25c. Une étude plus poussée des effets du H₂S sur ces composés (MPF et Cdc25) a permis de définir que l'action du gazotransmetteur sur la boucle d'auto-amplification principalement sur la phosphatase. En effet, le MPF n'est ni dissocié, ni inactivé en présence de NaHS et cela, quelle que soit la concentration utilisée.

La mesure de l'activité a été réalisée grâce à une méthode colorimétrique: une protéine humaine Cdc25c a été mise en présence de NaHS afin de démontrer un effet inhibiteur du donneur de H_2S . Cet effet est significatif et presque total à forte concentration (1 mM et 5 mM) (Résultats supplémentaires). Ces observations sont à corréler avec les effets obtenus lors de la micro-injection de cytoplasmes d'ovocytes matures à ces mêmes concentrations.

L'ensemble de ces observations nous permet de conclure que le NaHS entraine un effet inhibiteur de la reprise de méiose des ovocytes de xénope par, *a minima*, une inhibition de l'activité de la phosphatase Cdc25c. De plus, en présence de SOD (Super Oxyde Dismutase) et de catalase, utilisées respectivement à 150 unités et 80 unités, enzymes anti-oxydantes capables d'éliminer les ROS (Reactive Oxygen Species), l'activité du NaHS sur la maturation est diminuée (Article 1, Figure 7). Dans nos conditions, un lien entre les ROS et Cdc25c est ainsi suggéré et s'avère être une voie de travail solide sachant qu'il a été démontré dans une étude que les ROS modifiaient l'activité de Cdc25c *via* une cystéine présente dans le domaine catalytique de la phosphatase, cystéine sensible au stress redox (Rudolph, 2005). Toutefois, nous ne pouvons exclure l'hypothèse qu'une S-Sulfhydration soit aussi impliquée dans notre contexte.

Deux mécanismes particuliers ont donc été mis en évidence : une action d'inhibition de la reprise de méiose associée à la production de ROS ainsi qu'une action d'inhibition de l'un des acteurs majeurs de la boucle d'auto-amplification du MPF : Cdc25c.

4. Effet du NaHS sur le développement précoce du xénope.

4.1. Généralités sur le développement

Le développement de l'ovocyte de xénope peut se résumer en quatre grandes étapes présentées dans la figure 30. Ces différents stades se caractérisent par des évènements morphologiques, cellulaires et moléculaires. Ces évènements se déroulent toujours dans une cinétique et un ordre précis.



Figure 30 : Différentes étapes du développement embryonnaire du xénope. Après fécondation les embryons subissent de nombreux clivages successifs durant la segmentation. Au terme de ces clivages l'embryon au stade blastula va subir la gastrulation, ensemble de mouvements qui permet la mise en place des feuillets. L'embryon subit ensuite la neurulation durant laquelle la chorde et le système nerveux sont définis. Enfin une étape d'organogenèse permettra la mise en place des organes.

• La segmentation : Le premier clivage, ou division de segmentation, a lieu 1h30 après la fécondation et scinde l'œuf en deux cellules, ou blastomères. Un second clivage a ensuite lieu, 45 minutes plus tard, divisant l'œuf en 4 cellules. La division suivante se produit de manière asymétrique. Par la suite, les divisions se succèdent de manière rapide afin de donner une morula, ensemble de plusieurs blastomères, ayant l'aspect d'une petite mûre. Durant ces clivages, le volume global de l'embryon ne varie pas, les blastomères deviennent de plus en plus petits au fur et à mesure de la segmentation. Au terme de ces clivages l'embryon se trouve au stade blastula.



Figure 31 : Représentation de la gastrulation vue par l'hémisphère végétatif montrant l'évolution du blastopore depuis sa formation (stade encoche blastoporale) jusqu'à l'achèvement de la gastrulation (stade fente blastoporale) (source : http://www.snv.jussieu.fr/).

- La gastrulation : Alors que la segmentation se définit par une succession de divisions, la gastrulation est composée par un ensemble de mouvements morphogénétiques de grande ampleur, qui conduisent à la mise en place des feuillets embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Lors de cet évènement, on peut voir apparaître le bouchon vitellin, un groupe de cellules endodermiques situées au pôle végétatif. La formation de la fente blastoporale signe la fin de la gastrulation. Chez le xénope cette étape dure de 7 à 8 heures (Figure 31).
- La neurulation : Cette étape correspond à la formation du système nerveux. Lors de la gastrulation, les contacts établis entre le mésoderme et l'ectoderme induisent le neuroectoderme. L'ébauche du système nerveux se forme dans la région dorsale de l'embryon. Cette étape est caractérisée par la formation de deux bourrelets neuraux, qui se soudent sur le plan médian pour former un tube. Apparait alors le tube neural, marquant le début de l'organogenèse. À ce stade la polarité de l'embryon devient plus

marquée, le tube neural se trouvant sur sa face dorsale. L'axe antéro-postérieur est alors matérialisé par la formation de la tête et du tronc (Figure 32).



Figure 32 : Schémas interprétatifs des mouvements du neurectoderme au cours de la neurulation sur des sections transversales d'embryons depuis le stade de la plaque neurale (PN) (1) jusqu'à la formation du tube neural (TN) (5). Le neuroectoderme s'épaissie par rapport à l'épiderme limitant (1) et l'on observe un soulèvement des bourrelets neuraux (BN) (1,2), ainsi qu'un rapprochement des bourrelets neuraux vers le plan médian (en trait discontinu bleu) (3), l'affrontement des bourrelets neuraux (4) et la soudure des bourrelets neuraux permettant la formation du tube neural qui se sépare de l'épiderme (Ep). En bleu clair, sont représentés les tissus à l'origine du tube neural et en bleu tramé, sont représentées les cellules de la crête neurale qui s'individualisent au moment de la soudure des bourrelets neuraux. Arch: Cavité de l'archentéron, Ch: chorde, End: endoderme, S: somites. (Source http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xénope1/)

• L'organogenèse : durant cette étape, des massifs cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires, ectoderme, mésoderme et endoderme, se différencient en ébauches ou bourgeons d'organes. Lors de cette étape, l'embryon se modèle peu à peu pour prendre une forme de têtard : le bourgeon caudal se dessine. Parmi les évolutions morphologiques que subira ce bourgeon, on peut noter un allongement (commencé avec une élongation de l'embryon durant la neurulation), l'individualisation des yeux, des branchies externes, du cœur, d'une glande adhésive et d'un tube digestif. Il se dote aussi de mouvement par le biais de contractions musculaires.

Par la suite se déroule une étape de croissance.

4.2.Le NaHS entraine une diminution du taux de fécondation.

Des fécondations ont été effectuées en présence du donneur de H_2S et la quantité d'ovocytes fécondés a été relevée. Afin de déterminer le taux de fécondation, la « rotation corticale » ou « rotation d'équilibration » a été utilisée (Figure 33).



Figure 33 : Schéma du phénomène d'équilibration. Un détail met en évidence la création de l'espace périvitellin qui désolidarise l'ovocyte de ses enveloppes. PA: Pôle Animal, PV: Pôle Végetatif. (d'après http://www.snv.jussieu.fr/). Une demi-heure après la pénétration du spermatozoïde, l'ovocyte de xénope s'oriente en fonction de la pesanteur. L'hémisphère végétatif, plus dense, se tourne vers le bas, laissant apparaitre vers le haut l'hémisphère animal pigmenté. Cela provient de la formation d'un espace périvitellin entre la membrane de fécondation, ancienne enveloppe vitelline et la membrane plasmique. L'ovocyte se désolidarise de l'enveloppe vitelline, ce qui permet une rotation en fonction de la pesanteur et donc du gradient vitellin.

En présence de NaHS le taux de fécondation est diminué de façon indépendante de la dose. Le taux de fécondation passe de 71,53% en condition contrôle à 50,50 ; 41,60 et 43,23 % en présence de 100 μ M, 500 μ M et 1 mM de NaHS respectivement. Cependant seule la concentration de 500 μ M entraine une baisse statistiquement significative, les autres résultats dénotant uniquement une forte tendance à la diminution du taux de fécondation (Résultats supplémentaires).

4.3.Le NaHS entraine un retard de développement dépendant de la dose, mais n'influe pas sur l'apoptose.

La taille des embryons de xénope permet de suivre leur évolution sous loupe binoculaire (Figure 34). Ainsi, les temps de passage des stades précoces des embryons ont été relevés afin de déterminer s'il existait un retard, ou une accélération, du développement des embryons mis en contact du NaHS jusqu'au stade 6. De même, le nombre d'embryons entrés en apoptose a été relevé à temps fixes dans les différentes conditions.

La présence de NaHS entraine un retard de développement des embryons jusqu'à atteindre un retard de 82 minutes par rapport aux embryons contrôles au stade 6 en présence de NaHS à 1 mM. Ce retard est observé dès le passage du stade 2 et s'amplifie jusqu'au stade 6. Seule la plus

forte concentration de 1 mM démontre un retard statistiquement significatif (0,01 .Aucun effet n'a été observé quant au taux d'apoptose des embryons. Il n'y a ni retard ni accélération de la mort cellulaire en présence de NaHS et cela, quelle que soit la concentration (Résultats supplémentaires).



Figure 34 : Photos des différents stades de développement de l'embryon de xénope en condition contrôle.

En conclusion, nous avons pu démontrer que le NaHS entrainait, non seulement, un retard, voir à forte concentration une inhibition, de la reprise de méiose des ovocytes de xénope, mais influençait aussi la fécondation et le développement précoce des embryons. Nous avons pu déterminer que Cdc25c, un des membres de la boucle d'auto-amplification, était l'une des cibles potentielles du NaHS pour ses effets sur la maturation. Ces effets sont aussi ROS dépendants. Enfin nous avons montré pour la première fois que le NaHS entrainait une inhibition de la traduction dans les ovocytes de xénope. Effet du NaHS sur la reprise de méiose et le développement précoce du xénope.

PUBLICATION 1

Hydrogen sulfide modulates cell cycle transition during Xenopus meiosis and early development.

Gelaude A¹, Marin M¹, Cailliau K¹, Lescuyer-Rousseau A¹, Martoriati A¹, Bodart JF¹.

Introduction

Gasotransmitters have been found to exert a wide variety of functions. Gasotransmitters include carbon monoxide, nitric oxide and hydrogen sulfide. The latter is involved in many different physiological processes, non-exhaustively including inflammation, neuromodulation, cytoprotection, regulation of vascular tone, vascular remodeling, protective role in heart diseases and atherosclerosis, as well as in pulmonary hypertension (Qu, Lee, Bian, Low, & Wong, 2008; Wang, Du, & Cui, 2015). Hydrogen sulfide (H₂S) is produced from three enzymes, namely aminoacid L-cystein by Cystathionine β -Synthase (CBS), Cystathionine γ -Lyase (CSE) and 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3-MPST) (Wang, 2002; Shibuya et al., 2009b; Zhao et al., 2013). These three enzymes exhibit various levels of expression, according to the considered tissue. They are noticeably expressed in the reproductive organs (Guzmán et al., 2006; Srilatha et al., 2009; Ghasemi et al., 2012), where it was first assumed that H₂S metabolism mediates physiological functions, or at least, that alteration of H₂S metabolism could lead to reproductive abnormalities. Nevertheless, in this context, H₂S

Identified as expressed in reproductive systems in mice, rat and human (Sugiura et al., 2005; Liang et al., 2006; Patel et al., 2009), H_2S was mainly involved in male in the facilitation of the erectile function. This proerectile role was found in primates (Srilatha et al., 2006) rats, rabbits (Srilatha et al., 2007) and humans (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2009). A distinct distribution of CSE and CBS was also reported in rat testes, where the enzymes were respectively detected in Sertoli cells alone and in Sertoli, Leydig and germ cells (Sugiura et al., 2005). A role for H_2S in testis function has been suggested (Oi et al., 2001) but evidences remain scarce.

Limited studies have addressed the impact of H₂S on the reproductive function, as a pollutant. H₂S was associated in Finland with an increase in the rate of spontaneous abortion (Hemminki and Niemi, 1982) ; nevertheless, the subjects in this study might have also been exposed to other pollutants, also susceptible to increase such risk. Direct evidences for a role of H₂S at the physiological level in reproductive systems came from rodents, where CSE and CBS appeared to play different roles in female organs (Zhu et al., 2011). Lessons taken from knockout experiments underlined that if CSE knock-out exhibit no defects in reproductive functions (Yang et al., 2008), CBS is necessary for female fertility, though CBS was not detected in oocytes (Liang et al., 2006). CBS knock-out was reported to drive a decrease in uterine mass but no ovarian failure (Guzmán et al., 2006), though it has also been reported that invalidating CBS expression resulted (i) in decrease in follicles population in the same study (Guzmán et al., 2006) and (ii) in inhibition of oocyte maturation (Liang et al., 2007).

A main comment may be performed when considering the corpus of data obtained: studies on the impact of H_2S directly oocytes were scarcely performed. Recently, aging in porcine oocytes was prevented by H_2S donors (Krejcova et al., 2015). In addition, profiles of expression for CBS, CSE and 3-MPST were reported in the same model (Nevoral et al., submitted/in press). In this context, a direct effect of H_2S was reported on oocytes: H_2S donors accelerated meiotic resumption while inhibitors of H_2S metabolism prevented oocyte maturation (Nevoral et al., submitted/in press).

Xenopus oocytes have provided for many decades a classical model for studying cell cycle progression and cell death. Being a giant cell, the oocyte supplies the material sufficient for the production of 4000 cells without cellular growth or transcription (Gurdon, 1974); its volume is assumed to be equivalent to 50000 somatic cells. Blocked in prophase of the first meiotic division - in a state analogous to G2 phase - oocytes resume meiosis upon stimulation by progesterone, mimicking the steroid stimulation provided by follicular cells in vivo. Considered as an M-phase entry, the meiotic resumption is characterized at the morphological level by the occurrence of a white spot at the apex of cell, attesting the migration and dissolution of the germinal vesicle (germinal vesicle breakdown, GVBD). These oocytes progress from meiosis I until metaphase of meiosis II, in anticipation for fertilization. The migration of nuclear material towards the animal pole is followed by the condensation of the chromosomes and the organization of a meiotic spindle. At the molecular level, the meiotic resumption is triggered by the activation of an universal factor, the MPF (M-Phase Promoting Factor), which is activated by Cdc25c, a pivotal enzyme in the regulation of M-phase progression (Masui and Markert, 1971; Rime et al., 1994). In parallel to MPF, MAPK/Erk are activated (Ferrell et al., 1991). Such activation is requested for proper maturation : meiotic spindle formation (Baert et al., 2003; Bodart et al., 2005) and absence of DNA synthesis between the two meiotic divisions (Dupré et al., 2002).

We focused here on the effects of H_2S donors or inhibitors of the H_2S metabolism on G2/M transition in *Xenopus* oocytes. Analysis was performed at the single cell level, and emphasize that preventing H_2S metabolism accelerates meiotic resumption whereas H_2S donor NaHS prevents G2/M transition. We report that H_2S modulates directly oocyte meiosis in amphibian, and discuss the mechanisms of its action.

Material and methods

Reagents

All reagents were obtained from Sigma–Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France), except MS222 (tricaine methane sulfonate; Sandoz), collagenase (Roche Applied Science1) and antibodies (Santa Cruz Biotechnologie and Cell signaling). All tested solutions and media (ND96: 96mM NaCl, 2mM KCl, 1.8mM CaCl2, 1mM MgCl2, 5mM HEPES-NaOH, pH 7.5) were prepared daily or obtained by appropriate dilutions from stock solutions in ND96 medium.

Handling of frogs and oocytes

After anesthetizing of the *Xenopus* females (purchased from the University of Rennes I, France) by immersion in 1 g/L MS222 solution, ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium. Fully grown stage VI oocytes were isolated and defolliculated by partial ovarian tissues digestion with a collagenase treatment for 30min (1mg/ml collagenase A) followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium until experiments. All animal experiments were performed at the animal facility of Lille University according to the rules of the European Community Council guidelines (86/609/EEC) for laboratory animal experimentation. The animal protocol was approved by the local institutional review board (Comité d'Ethique en Experimentation Animale Nord-Pas-De-Calais, CEEA 07/2010).

Treatment and analysis of meiotic resumption

Meiotic resumption was induced by incubating oocytes in ND96 medium containing 10 μ M of progesterone (4 mg/mL; Sigma–Aldrich). Maturation process (M-Phase entry) was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte. Oocytes were incubated with NaHS (100 μ M-5 mM), AOAA (aminooxyacetic acid - 10 mM), KGA (ketoglutaric acid - 10 μ M), PAG (DL-propargylglycine - 10 μ M), SOD (Super Oxyde Dismutase, 150 units), Catalase (80 units) or with H-89 (50 μ M) a PKA inhibitor. Oocytes were placed at 23°C. An individual observation of oocytes was performed each hour during several hours under binocular microscope and the number of oocytes with a white spot was scored.

Micro-injection of mature oocyte cytoplasm

Defolliculated oocytes were matured overnight in the presence of progesterone (4 mg/ml) at 19°C. Oocytes with a white spot were selected and rinsed to remove all trace of progesterone. 40 nl of cytoplasm were withdrawn from donor oocyte, using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo) and 10 nl were injected at the equator of recipient immature oocytes. Before micro-injection, immature oocytes were exposed to the NaHS (100 μ M-5 mM) during 1 h . Microinjected oocytes were placed at 23°C for maturation and the white spot appearance was monitored hourly.

Heat fixation and GVBD analysis

After phenotypical analysis of the maturation process (appearance of white spot), oocytes were heated during 15 minutes at 100°C. Then they were bisected to analyze the absence or the presence of the germinal vesicle.

Cytological analysis

Oocytes were fixed in Smith reagent (Smith A: Potassium Bichromate 17mM; Smith B: formol and acetic acid 80/20%) for a minimum period of 12 h in darkness. They were then dehydrated and embedded in paraffin. Section of 7 microns were cut and stained with the nuclear red (0.1g of nuclear red QSP 100 ml aluminium sulfate 5%) to reveal nuclear structures and chromosomes, and with picroindigo carmine (0.25 g of picroindigo carmine QSP 100 ml saturated picric acid) for cytoplasmic structures. Such staining enable spindles and condensed chromosomes detection, even if ectopic or atypic [Flament et al., 1996,1997 + Gelaude et al., 2015].

Electrophoresis and western-blot

Eggs were lysed in homogenization buffer (PY : (50 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 0.5% Triton X100, 5 mM MgCl2, 1 mg/mL bovine serum albumin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL soybean trypsin inhibitor, 10 µg/mL benz-amidine, 1 mM PMSF, 1 mM sodium vanadate ; 10µL / Oocyte)) and centrifuged for 5 min at 10,000g (4°C) to eliminate yolk platelets. Supernatants were added with one volume of Laemmli 2X buffer 4% beta-mercaptoethanol, heated at 100°C for 3 min and stored at-20°C until analysis. Proteins from oocytes were separated by SDS–PAGE (15–17%) and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom). Blots were blocked with 10% low fat dry milk and incubated with specific antibodies. p90Rsk was detected using the polyclonal rabbit antibodies (p90Rsk1 C-21 sc231, Santa Cruz Biotechnology ; 1/1000), ERK2 was detected using mouse monoclonal antibodies (Erk2 D-2 sc1647, Santa Cruz Biotechnology ; 1/3000), anti-P-H3 antibodies (S10, Cell Signaling ; 1/1500), P-Tyr15 Cdk1 using overnight incubation with mouse monoclonal antibodies (Sigma Aldrich ; 1/1000),
CBS using overnight incubation with mouse monoclonal antibody (Sigma Aldrich ; 1/1000), MPST using overnight incubation with rabbit monoclonal antibody (Sigma Aldrich ; 1/1000), Anti Cdc2 rabbit monoclonal antibody (17, Santa Cruz Biotechnology ; 1500), Cycline B2 (Cyclin B2 sc53239, Santa Cruz biotechnology ; 1/1500) and anti-cytochrome C (7H8.2C12, ab13575, Abcam, 1/1500). Nitrocellulose membranes with bounded primary antibody were then incubated with appropriate secondary antibodies (Sigma–Aldrich). The signals were detected using a chemiluminescent assay (ClarityTM Western ECL Substrate, Bio-Rad)

Co-immunoprecipitation

Cdc2 immunoprecipitations were performed on 50 immatures oocytes lysed with 200 μ L of PY. After centrifugation at 4°C for 15 minutes at 10000g, the protein phase is incubated with different concentrations of NaHS (100 μ M, 500 μ M, 1 mM et 5 mM) for 24h at 4°C. Protein extracts are washed in the presence of beads alone for 1 h at 4°C. Anti-cdc2 antibody (1: 200; Invitrogen) was added for 2 hours at 4°C. Protein A-Sepharose beads (5 mg, Sigma) were added for one hour at 4°C. The immune complexes were collected by centrifugation (10000g, 1min, 4°C), rinsed 3 times and resuspended in 1 volume of 2x Laemmli buffer. Proteins were then separated on 12.5% gels and analyzed by immunoblotting using an anti Cdc2 and an anti-Cyclin B2 according to western-blotting protocol.

Histone H1 and Myelin Basic Protein Double Assay

Assays were made on protein extracts of 50 immature oocytes lysed in 200 μ L of PY. After centrifugation at 4°C for 15 minutes at 10000g, the protein phase was incubated with different concentrations of NaHS (100 μ M, 500 μ M, 1 mM et 5 mM) for 24h at 4°C. Samples were immediately frozen and stored at -80°C until analysis. The kinase activity of the MPF and MAPK pathway were performed. Briefly, their capacity to phosphorylate external substrates were tested, specifically histone H1 (H1) for MPF and Myelin Basic Protein (MBP) for MAPK,. The kinase reaction was initiated by addition of 5 μ l of buffer consisting of 100 mM 3-[n-morpholino] propanesulfonic acid pH 7.2, 20 mM para-nitrophenyl phosphate, 40 mM β -glycerolphosphate, 20 mM MgCl2, 10 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 5 μ M cAMP-dependent protein kinase inhibitor, 2 mM benzamidine, 40 μ g/mL leupeptin, 40 μ g/mL aprotinin, 600 μ M ATP, 2 mg H1/ml, 3 mg MBP/mL) and 500 μ Ci/mL [γ -32P]ATP (GE Healthcare Life Sciences, UK). The reaction was conducted for 30 min at 30°C and blocked by the addition of 10 μ l of Laemmli buffer and boiling for 3 min. After electrophoresis on 15% SDS PAGE gels, it was

stained with Coomasie Blue R250, destained overnight, dried and autoradiographed. Phosphorylated histone H1 and MBP signals were visualized by MultiGauge 2.0 software.

Apoptosis analysis

Oocytes stimulated by progesterone were put, after maturation completion, at room temperature for 52 hours in presence, or not, of NaHS (5 mM). Apoptosis phenotypes were seeked at specific times throughout 52 hours. Proteins from oocytes of the different conditions were extract at 8h, 24h, 48h, 56 and 72h. Proteins were then separated on 12.5% gels and analyzed by immunoblotting using an anti ERK, anti-Cyclin B2, anti-Rsk and anti-Cytochrome C according to western-blotting protocol.

Statistical Analysis

All results are shown as mean +/-standard error of the mean (SEM); N refers to the number of separate experiments performed (number of females) while n is the number of treated oocytes. Experiments were at least performed in triplicates. Significant differences were assessed with SigmaStat 3.1 software (SysStat, Erkrath, Germany) by means of one-way analyses of variance followed by post-hoc Tukey's tests. Statistical significance was accepted for *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

Results

1. H₂S donor NaHS prevents meiotic resumption in a dose-dependent manner in *Xenopus* oocytes

NaHS was used at increasing concentrations from 100 μ M to 5 mM. NaHS lead to a significant decrease of the number of oocytes with a white spot, even at the lowest concentration. In the control condition, 30 hours after addition of progesterone, 60% of the oocytes showed a maturation spot against 40% and 10% in the presence of 100 μ M and 5 mM of NaHS (Figure 1.À and B). The effect on the meiosis resumption was dose-dependent. The highest the concentration of NaHS was, the strongest was the effect of the donor. (Figure 1.B).

In order to check if oocytes without white spot were still blocked in prophase I, the phosphorylation status of Erk, Rsk (downstream Erk effector), Cdc2, and Histone H3 (downstream target of MPF) were analyzed by western blot at the single cell level. While prophase I oocytes exhibited phosphorylation of Cdc2 on tyrosine 15 and absence of Histone H3, Erk, and Rsk phosphorylation, mature oocytes showed phosphorylation of Histone H3, Erk, and Rsk and dephosphorylation of Cdc2 on tyrosine 15. Oocytes with a maturation spot exhibited both phosphorylated ERK and Rsk and lacked phosphorylation of Cdc2 on tyrosine 15, unlike the oocytes with no maturation spot (Figure 1.C). Thus, there are two separate populations: a population of immature oocytes that do not exhibit maturation spot – cells still arrested in prophase I - and a mature population exhibiting a maturation spot - cells blocked in metaphase II.

The all-or-none commitment of oocytes towards M phase entry and the formation of a bipolar spindle were verified by cytological analysis. NaHS did not disrupt the establishment of the spindle. All studied oocytes (n=10; N _{females} = 3) showed a spindle anchored perpendicularly to the membrane and chromosomes aligned on the metaphase plate (data not show). No oocyte without white spot undertook GVBD. Thus, white spot and GVBD were closely related, regardless the treatment.

2. Joint inhibition of H2S metabolism key enzymes accelerates of the meiotic resumption in Xenopus oocytes

We tested the presence of enzymes of the H₂S metabolism in *Xenopus* oocytes. The three enzymes: CBS, CSE and MPST were detected either in immature oocytes in PI and mature oocytes blocked in MII (Figure 2.A).

These enzymes are present in oocytes, offering opportunity to inhibit their activity with specific chemical inhibitors: AOAA, PAG and KGA, which are respectively specific inhibitor of CBS, CSE and MPST (Reviewed : Szabó 2007). We tested the effects of H₂S metabolism inhibition on the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. When used alone or by pairs, chemical inhibitors of H₂S metabolism did not alter oocyte maturation (data not shown). However, a combination of the three inhibitors causes an acceleration of meiotic resumption. After 10 hours in the presence of progesterone and H₂S metabolism inhibitors, 90% of the oocytes present a maturation spot against 70% in the control condition (Figure 2.B and C). Values of the GVBD₅₀ indicate a significant acceleration of maturation. Indeed, oocytes of the control condition takes an average of 14 hours to reach 50% of maturation (GVBD₅₀=1) against 9h in the presence of inhibitors (GVBD₅₀=0.62) (Figure 2.D). So, the simultaneous inhibition of the three enzymes of H₂S metabolism and therefore, the absence of newly produced H₂S in the *Xenopus* oocyte, accelerated meiotic resumption.

3. H₂S donor effects are not related to PKA activity

Since NaHS may induce an increase of AMPc in *Xenopus* oocytes (Kimura, 2000), we tested the hypothesis that H₂S effects could be related to increased levels of PKA activity. Therefore, H-89, a PKA inhibitor, was used. In our hands, H-89 did not prevent meiotic resumption nor maturation of *Xenopus* oocytes when micro-injected at the concentration of 50 μ M. Oocytes exhibited a white spot 7 hours after the addition of progesterone (76.67% in the control condition against 85.56% with micro-injected H-89, without any statistical difference). Accordingly, no difference was observed in the kinetics of white spot appearance between these two conditions (Figure 3.A). In presence of progesterone alone, 76.67% of the oocytes showed a maturation spot and this percentage decrease in a dose dependent manner in presence of NaHS to reach 33,33% at a concentration of 5 mM. The use of H-89 and so, the inhibition of PKA activity, did not counteract the effect of NaHS. In presence of H89, the percentage of oocytes with a maturation spot were 53.33, 44.44 and 8.89% for NaHS at 500 μ M, 1 mM and 5 mM respectively (Figure 3.A). There was either no significant differences between oocytes treated with NaHS alone and with H-89 in the kinetic of white spot appearance. The GVBD₅₀ of control oocytes, only treated with progesterone, was normalized to 1. In presence of NaHS, the GVBD₅₀ increases, proof of a deceleration of the meiosis resumption. At the concentration of 500 μ M and 1 mM, the GVBD₅₀ up to 1.55 and 1.82. This slowdown is less pronounced but still present in NaHS supplemented with H-89. In this condition GVBD₅₀ up to 1.27 and 1.64 in the same NaHS concentration (Figure 3.B).

4. NaHS impairs protein synthesis

Xenopus oocytes translate heterologous mRNA when injected in their cytoplasm (Sigel, 1990; Cailliau and Browaeys-Poly, 2009). A Myt-Myc ARNm was micro-injected in oocytes preincubated during 15 minutes in NaHS at different concentrations. Translation of the protein after 8 hours was studied by western blotting. Since Erk is at a constant concentration in *Xenopus* oocytes, we used it as a charge indicator. Myt-Myc protein is absent from oocytes. After micro-injection of Myt-Myc ARNm, the translated protein was detected (Figure 4.A). In the presence of the highest concentrations of NaHS (1 mM and 5 mM), the inhibition was quite complete (Figure 4.A). The relative intensity of the bands was measured using the Image J software. With the lowest concentration (100 μ M and 500 μ M), the relative intensity decreased almost 50% and dropped to almost 90% with 5 mM (Figure 4.B). Thus, NaHS prevented the translation of ARNm in *Xenopus* oocytes and, so could interfere with protein synthesis requested for oocytes meiotic resumption.

5. NaHS abolishes self-amplification loop of MPF

Our next hypothesis was that NaHS may impair meiosis through impacting MPF autoamplification loop. To test this hypothesis experiment of micro-injection of mature oocyte cytoplasm in immature oocytes was perform. NaHS concentrations superior to 500 μ M lead to a total inhibition of meiotic resumption induced. In control oocytes, micro-injected without NaHS exposure, 94% of the oocytes showed a maturation spot. In a similar manner, 93 and 73% of the oocytes had a white spot in the presence of 100 μ M and 500 μ M of NaHS respectively. No white spot was observed in oocytes treated either with 1 mM or 5 mM (Figure 5.A). A close correlation between white spot occurrence and GVBD was confirmed by oocytes bisection after heat-fixation (90°C for 10 minutes).

Seven hours after micro-injection, oocytes were separated into two groups and were individually analyzed by immunobloting. Two populations were discriminated : (1) oocytes

remaining in prophase I and (2) oocytes at metaphase II. Microinjected oocytes exposed to low concentration of NaHS and showing a white spot, exhibited phosphorylated ERK and Rsk, active MPF and dephosphorylated Cdc2. Oocytes treated with high concentrations of NaHS, which did not exhibit white spot, were observed to provide phosphorylation pattern identical to those of immature oocytes (Figure 5.B). Thus, only the high concentrations of NaHS were able to cause an inhibition of the resumption of meiosis triggered by microinjection of mature oocytes cytoplasm.

6. NaHS does not dissociate the pre-MPF complex nor impact MPF activity

Since the auto-amplification loop of MPF was altered, we furthermore assessed the effects of NaHS on MPF. We first checked that NaHS may dissociate the pre-MPF complex. Coimmunoprecipitation of Cdc2 and Cyclin B2 was carried out on protein extracts from immature oocytes treated or not with NaHS at different concentrations for 24 hours. No dissociation of MPF was observed in presence of NaHS regardless the used concentration (Figure 6.A). Phosphorylated Cdc2 was still found to be associated to Cyclin B2.

Since pre-MPF is not dissociated in the presence of NaHS, there has been an accumulation of inhibitory phosphorylation of Cdc2 that can indicate that the MPF can no longer be activated. Action of NaHS on the resumption of meiosis could also explained by a direct inhibition of the kinase activity of the MPF. Phosphorylation of histone H3 suggested that the kinase activity of the protein was not affected in the presence of NaHS (Figure 6.A). Ser10 phosphorylation of H3 is assumed to be specific, although other kinases could be involved such as MAPK pathway (Schmitt et al., 2002). To test the activity of MPF, a Histone H1 kinase assay was undertaken, since Histone H1 is a specific target of Cdk1 and Cdk2. A similar assay was undertaken with MBP to test the activity of MAPK in presence of NaHS and revealed that MAPK activity was not altered by hydrogen sulfide production (data not shown).

Mature protein extracts were treated for 1 hour at various concentrations of NaHS. A control without kinase activity was obtained by boiling a mature protein extract at 100°C for 15 minutes. Obtained results reported a slight decrease of MPF kinase activity in the presence of NaHS. Surprisingly, this decline appeared to be greater in intermediate concentrations (500 μ M and 1 mM) than in the lowest and highest concentrations we used (100 μ M and 5 mM) (Figure 6.C). However, when intensities were studied using an image processing software, the kinase activity test revealed no significant differences between the control mature extract and thus

treated with NaHS at different concentrations (Figure 6.B). Only boiled control has significantly reduced kinase activity.

7. NaHS effects are partially ROS-dependent

NaHS has been reported to produce ROS (Reactive oxygen species) (Truong et al., 2006; Eghbal et al., 2004). ROS dependent effects can be counteracted by the use of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (Truong et al., 2006). These two enzymes have been used at 150 and 80 units respectively to investigate whether the effects of NaHS on the meiosis resumption in Xenopus oocytes could be related to ROS. SOD and catalase used alone did not cause any effect on the resumption of meiosis, as previously reported (Dehennaut et al., 2007). There was no difference between the control oocytes only treated with progesterone and oocytes treated with the antioxidant enzymes. The percentage of oocytes with a maturation spot after 24h was almost equivalent and there was no difference when comparing GVBD₅₀ between the different treatments. Controls oocytes exhibited 90.36% of white spot against a 93.16% in the presence of SOD and catalase (Figure 7). The GVBD₅₀ was nearby 6 hours in the presence of enzymes against 7 hours for oocytes only treated with progesterone (data not show). Similarly, these oocytes showed no abnormalities when studied by western blotting or through cytological analysis. Signaling pathways were not disturbed and stimulated oocytes showed typical spindle, perpendicular to the membrane with well-aligned chromosomes.

NaHS resulted in a decrease of the amount of oocytes entering M phase. For NaHS concentration of 500 μ M, 1 mM and 5 mM the final percentages of oocytes with a maturation spot were 65.67; 54.32 and 32.26% respectively. Similarly, GVBD₅₀ increased in oocytes treated with these concentrations, as observed previously (Figure 7). In presence of SOD and catalase, a decrease in amount of oocyte with a maturation spot in comparison with control condition in presence of NaHS can be seen. In conditions were SOD and catalase were added, 78.21; 72.39 and 64.44% of oocytes exhibited a maturation spot in the presence of NaHS at the concentration 500 μ M, 1 mM and 5 mM respectively. There was no longer significant statistical differences, suggesting that the effects of NaHS on the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes were partially related to ROS effects. However, especially in the presence of high concentrations (5mM), there was still an increase in GVBD₅₀, attesting for the inhibition of GBVD (Data not Show).

8. NaHS does not promote nor protect from apoptosis

Because augmentations in ROS levels are correlated with an increase in apoptosis in Xenopus laevis (Coll et al., 2007; Zhou et al., 2009), one could have expected that NaHS could affect oocytes survival when the latter are blocked at metaphase II. After maturation completion, oocytes stimulated by progesterone were put at room temperature for 52 hours in the presence or not of NaHS at the concentration of 5 mM. Apoptosis can be observed visually on Xenopus oocytes : the animal hemisphere exhibits numerous white dots or holes within its membrane, distaining of both vegetal and animal hemispheres can be observed pole while oocytes appeared to collapse (Du Pasquier et al., 2011; Tokmakov et al., 2011). Oocytes with these characteristics were recorded at fixed time. Kinetics of apoptosis entry for oocytes in the presence of NaHS seemed slower without any significant differences but, at 48 hours, like in controls batches, all oocytes underwent apoptosis (Figure 8.A). These experiments suggested that the increase of H₂S, by using NaHS, nor potentiate or delay death by apoptosis in MII oocytes. To confirm this phenotypical observations, proteins involved in apoptosis were studied by immunoblotting: Cytochrome C generated by mitochondria during apoptosis, degradation of Cyclin B and loss of Rsk. In both conditions, a loss of phosphorylation of the protein Rsk after 48h was observed. Only the control condition showed a total loss for Rsk protein. Cyclin B was degraded and the amount of Cytochrome C increased similarly over time in both conditions. Except for the absence of degradation of Rsk in the presence of NaHS, no difference was noticeable between the two conditions tested. The same amount of Cytochrome C appears to be generated out, and Cyclin B appeared to be degraded at the same rate (Figure 8.B).

Discussion

Few studies have undertaken to untangle the role of H₂S in reproductive tissues, by targeting gametes. Among the three enzymes responsible - CBS, CSE & 3-MPST - for the H_2S metabolism, CBS and CSE have been detected in female reproductive tractus (vagina, uterus, ovaries) as well as in placental and fetal tissues (Patel et al., 2009; Srilatha et al., 2009; Zhu et al., 2011). Effects of H₂S in these tissues were thought to be mainly related to vasodilatation (Bhatia et al., 2005b) or hypoxia (preeclampsia case in placenta, (Soleymanlou et al., 2005; Patel et al., 2009)). Noticeably CBS, CSE and MPST were detected either in immature and mature oocytes in Xenopus, whereas these enzymes exhibit a different profile than in porcine oocytes. In the latter context, CBS, CSE and MPST protein levels drop between meiosis I and II, and are not detected in metaphase II-blocked oocytes (Nevoral et al., in press). The differences in the expression profiles between the two species offer a first sight on the difference of oocytes behaviors toward H₂S modulation. Suggesting that H₂S plays a role at the physiological level in modulation of oocyte meiosis, a joint inhibition of CBS, CSE and MPST drove an clear acceleration of meiosis. One can also underline that the inhibitors AOAA, PAG and KGA had to be used conjointly but not by pairs: used solely or by pairs, the inhibitors did not exert any measurable effect on meiotic resumption (data not shown); similar observations were gathered in porcine oocytes (Nevoral et al., in press).

In accordance with the observations we obtained with the joint inhibition of CBS, CSE and MPST, H₂S donor prevented in dose-dependent manner the G2/M transition in *Xenopus* oocytes, when induced by progesterone. A dramatic decrease in GVBD rate is correlated with the highest concentrations. To circumscribe the mechanisms sensitive to H₂S and crucial to meiotic resumption, we tested several hypothesis, standing on the statements that PKA inhibition, protein translation, MPF and MAPK activations were requested for proper G2/M transition and meiosis. Since NaHS was previously reported to increase AMPc levels in *Xenopus* oocytes (Kimura, 2000), we first tested the hypothesis that H₂S effects could be related to PKA. We failed to observe any effect of PKA inhibitor H89 on H₂S effects and therefore, we assume that PKA is not part of the H₂S action on meiosis. Noteworthy, we took advantage of the amenability of the *Xenopus* oocytes as a system for heterologous expression and micro-injected a tagged-Myc Myt mRNA to test for its translation in presence of H₂S donor. In NaHS conditions, we observed no or little tagged-Myc Myt. Thus, H₂S acts at the translational machinery level, which has not been reported elsewhere before.

Since protein translation was impacted by H₂S, we used mature oocyte cytoplasm because the latter drives a meiotic resumption not depending upon protein translation is *Xenopus laevis* (Reynhout and Smith, 1974; Drury and Schorderet-Slatkine, 1975; Wasserman and Masui, 1975). When oocyte were subjected to such micro-injection, only the highest concentrations of NaHS abolished GVBD. Micro-injection of mature oocyte cytoplasm activates a self-amplification loop, that embed MPF and Cdc25c together (Karaiskou et al., 2004; Karaïskou et al., 1999; Abrieu et al., 1998). In one hand, we analyzed the potential ability of H₂S to split the partners of MPF, Cyclin B2 and Cdc2 (Hochegger et al., 2001; Dorée and Hunt, 2002). Cyclin B2 and Cdc2 were never teared apart when exposed to NaHS. In another hand, we tested the possibility that H₂S could affect MPF enzymatic activity itself: no effect on MPF was observed, based on Histone H1 kinase assay. We similarly tested the effects of NaHS on MAPK activity but did not observe any effect (data not shown).

The cellular redox status is determined by the balance between Reactive Oxygen Species (ROS) production through the electron transport chain and the NADPH oxidase system, and sequestration, which is achieved by the glutathione and thioredoxin. ROS are responsible for numerous cell damage (Chen et al., 2015); in Xenopus laevis oocytes, the increase in ROS has been correlated to an elevation in apoptosis rate (Coll et al., 2007; Zhou et al., 2009). In our hands, we did not observe any increase in apoptosis levels upon addition of NaHS in the medium, while oocytes reenter meiosis and progress until metaphase II. Moreover, while H₂S donor Na₂S offered protective effects towards aging in porcine oocytes (Krejcova et al., 2015), NaHS altered by no means the survival rate of metaphase II-blocked oocytes. In addition, ROS affect many proteins including those involved in cell cycle (Chen et al., 2015). These ROSdependent effects are known to be counteracted by the use of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and Catalase (Truong et al., 2006; Berger and Wilde, 2013). SOD and Catalase have not effects on meiosis, as previously reported (Dehennaut et al., 2007), as we also observed. SOD and Catalase did impact the effects of H₂S : the percentage of oocytes entering M-phase tend to diminish, without being statistically different from the controls. Such observation would suggest that NaHS acts mainly through ROS. However, we already stated that H₂0₂ does not prevent GVBD (Dehennaut et al., 2007). Therefore, it is unlikely that ROS production per se explains the effects of NaHS on oocytes. The hypothesis that ROS and H₂S act in synergy has be then considered.

Like nitric oxide, H₂S can engage covalent reactions with proteins and thus modulates their structural properties and functions. Indeed, S-Sulfhydration - H₂S addition to Cys-Thiol, or persulfide formation (-SSH) - affects a large variety of proteins (Kimura, 2013). Among these proteins, protein-phosphatases have been reported to be subjected to S-Sulfhydration, *i.e.* PTP1B in blood cells 93T (Krishnan et al., 2011) and Cdc25 in breast cancer cells (Viry et al., 2011). Thus, S-Sulfhydration might be seeked on protein-phosphatases, as well as on proteins involved in the translational machinery in Xenopus oocytes, though regulators of translational machinery have not been yet reported for S-Sulfhydration. Also, it can be assume that S-Sulfhydration of Cdc25c could be responsible for an inactivation of the protein-phosphatase and the abolishment of the MPF auto-amplification loop. This hypothesis is corroborated by the fact that phosphorylation of Cdc2 Tyrosine 15 residue seemed to be increased in a dosedependent fashion. In addition, two lines of evidences may strengthened this hypothesis : (i) while, it is more and more widely accepted that S-Nitrosylation and S-Sulfhydration occur on the same proteins, the S-Nitrosylation of Cdc25 has been identified (Tomko and Lazo, 2008; Foster et al., 2009a; Majumdar et al., 2012), (ii) a cysteine residue, being crucial for enzymatic activity, is targeted by ROS, the latter driving an inactivation of Cdc25 (Rudolph, 2005).

Finally, while the main characteristics of meiosis appeared to be similar in porcine and xenopus oocytes (dependence upon protein synthesis, spindle morphogenesis relying on both MPF and MAPK pathway activation, meiotic resumption independent upon MAPK activation (Bodart, 2012) responses towards perturbations driven by H₂S differ. Such differences may also arise from the different nature of the H₂S donor used (Nevoral et al., in press). In any way, further works are requested to characterize the nature of oocytes sensitivity towards H₂S and determine its impact in physiological and pathological processes.

Acknowledgements

Figure Legends



Figure 1: NaHS inhibits in a dose dependent manner the meiosis resumption induced by progesterone. (A) Oocytes were incubated (or not) in NaHS at different concentrations and stimulated by progesterone. Other oocytes were maintained in culture in progesterone alone (Prog). Oocytes with a white spots were recorded every hour for 10h and at 24h to 30h. (B) Percentage of oocytes with a white spot after 30 hours after addition of progesterone. Oocytes were incubated (or not) in NaHS at different concentrations. (C) Western blot of p90RSK, ERK, P-Tyr Cdc2 and phospho H3. Oocytes were incubated (or not) in NaHS at different concentrations and progesterone. Some oocytes were maintained in culture medium without treatment (PI) and some oocytes in progesterone alone (MII). Oocytes were sorted into two group : oocytes without a white spot (NWS) or with a white spot (WS). N=3 ; n=20. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.



Figure 2: H2S metabolism inhibitor causes an acceleration of the meiosis resumption. (A) Western blot analysis of the different enzymes of the H2S metabolism: MPST, CSE and CBS. Enzyme can be detected in oocytes maintained in culture medium without treatment (PI) and some oocytes in progesterone alone (MII). (B) Oocytes were incubated (or not) in presence of H2S metabolism inhibitors (AOAA, PAG and KGA) and progesterone. Oocytes with a white spots were recorded every hour for 10h and at 24h. (C) Percentage of oocytes with a white spot after 24 hours after addition of progesterone. Oocytes were incubated (or not) in H2S metabolism inhibitors (AOAA, PAG, KGA) and progesterone. (D) GVBD₅₀ corresponded to the time required to obtain 50% of mature oocytes. GVBD₅₀ were normalized on GVBD₅₀ of the oocytes only treated with progesterone. N=3 ; n=20. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001. No statistical significance was observed.



Figure 3. NaHS effects on meiosis resumption are not due to an increase of PKA activity. (A) Percentage of oocytes with a white spot 7 hours after addition of progesterone. Oocytes were incubated (or not) in presence of NaHS at different concentration, H-89 (50 μ M) and progesterone. (B) GVBD₅₀ corresponded to the time required to obtain 50% of mature oocytes. GVBD₅₀ were normalized on GVBD₅₀ of the oocytes only treated with progesterone. Δ = oocytes did not reach 50% of GVBD. N=3 ; n=15. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.



В



Figure 4: The NaHS results in an inhibition of protein synthesis. (A) Western blot of Myc and ErK made from immature oocytes = PI or oocytes micro-injected with mRNA of a protein Myc tagged and microinjected. Oocyte were micro-injected after incubation for 15 minutes in NaHS at different concentration (B) relative intensity of Myc bands. The Myc and Erk band intensity was evaluated using the Image J software in order to normalize the intensity of Myc bands depending on the corresponding charge indicator Erk band.



Figure 5: High concentration of NaHS inhibits the meiosis resumption induced by micro-injection of mature oocytes. (A) Percentage of oocytes with a white spot after 7 hours after micro-injection of mature oocytes cytoplasm. Oocytes were incubated (or not) in NaHS at different concentrations. (B) Western blot of p90RSK, ERK and P-Tyr Cdc2. Oocytes were incubated (or not) in NaHS at different concentrations and micro-injected with mature oocytes cytoplasm. Some oocytes were maintained in culture medium without treatment (PI) and some oocytes only micro-injected (MII). Oocytes were sorted in two group : oocytes without a white spot (NWS) or with a white spot (WS). N=3 ; n=15. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.



FIG 6: The NaHS is not able to cause a separation of the MPF complex and have no effect on his activity . (A) Immunoblots of total Cdc2 protein and Cyclin B after immunoprecipitation of Cdc2 protein. Immature extracts were treated or not with NaHS at different concentrations for 24 h at 4°C. Immature protein extracts were placed in contact of Cdc2 antibody O/N then precipitated on sepharose beads for 1h at 4°C. (B) MPF relative activity normalized on the activity of mature control. The mature protein extracts were treated or not with NaHS in different concentrations (100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 5 mM) or heated for 30 minutes at 100°C (Mature boiled). (C) Autoradiography of radioactive ATP incorporation of histone H1 by the MPF. The mature protein extracts were treated or not with different NaHS concentrations (100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 5 mM) or heated for 30 minutes at 100°C (Mature boiled). N=3 ; n=15.



Figure 7: NaHS effects on meiosis resumption are ROS dependant. Percentage of oocytes with a white spot 10 hours after addition of progesterone. Oocytes were incubated (or not) in presence of NaHS at different concentrations, SOD (150 units), Catalase (80 units) and progesterone. N = 5 ; n = 20



Figure 8: NaHS has no effect on apoptosis in *Xenopus* **oocytes.** (A) Survival rates of mature oocytes in presence or absence of NaHS at the concentration of 5 mM. Light grey : mature oocyte without any treatment, Dark grey : mature oocyte in presence of 5 mM NaHS. The number of dead oocytes was pick up every hours for period of 9h. (B) Western blot of p90RSK, ERK, Cyclin B2 and Cytochrome C. Oocytes were incubated (or not) in NaHS at 5 mM. Other oocytes were maintained in culture medium without treatment (PI) or in progesterone alone (MII).

References

Abrieu, A., T. Brassac, S. Galas, D. Fisher, J.C. Labbé, and M. Dorée. 1998. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. J. Cell Sci. 111 (Pt 1:1751–7.

Baert, F., J.-F. Bodart, B. Bocquet-Muchembled, A. Lescuyer-Rousseau, and J.-P. Vilain. 2003. Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 278:49714–20.

Berger, L., and A. Wilde. 2013. Glycolytic metabolites are critical modulators of oocyte maturation and viability. PLoS One. 8:e77612. doi:10.1371/journal.pone.0077612.

Bhatia, M., F.L. Wong, D. Fu, H.Y. Lau, S.M. Moochhala, and P.K. Moore. 2005. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. FASEB J. 19:623–5. doi:10.1096/fj.04-3023fje.

Bodart, J.-F.L., F.Y. Baert, C. Sellier, N.S. Duesbery, S. Flament, and J.-P. Vilain. 2005. Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. Dev. Biol. 283:373–83.

Bodart, M.J. and J.-F.L. 2012. Aneuploidy in Health and Disease. Z. Storchova, editor. InTech.

Cailliau, K., and E. Browaeys-Poly. 2009. A microinjectable biological system, the Xenopus oocyte, as an approach to understanding signal transduction protein function. Methods Mol. Biol. 518:43–55.

Chen, J., L. Lin, J. Su, B. Li, X. Zhang, and T. Chen. 2015. Proteomic analysis of G2/M arrest triggered by natural borneol/curcumin in HepG2 cells, the importance of ROS-p53 pathway. J. Agric. Food Chem.

Coll, O., A. Morales, J.C. Fernández-Checa, and C. Garcia-Ruiz. 2007. Neutral sphingomyelinase-induced ceramide triggers germinal vesicle breakdown and oxidant-dependent apoptosis in Xenopus laevis oocytes. J. Lipid Res. 48:1924–35. doi:10.1194/jlr.M700069-JLR200.

d'Emmanuele di Villa Bianca, R., R. Sorrentino, P. Maffia, V. Mirone, C. Imbimbo, F. Fusco, R. De Palma, L.J. Ignarro, and G. Cirino. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:4513–8.

Dehennaut, V., T. Lefebvre, C. Sellier, Y. Leroy, B. Gross, S. Walker, R. Cacan, J.-C. Michalski, J.-P. Vilain, and J.-F. Bodart. 2007. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in Xenopus laevis oocytes. J. Biol. Chem. 282:12527–36.

Dorée, M., and T. Hunt. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? J. Cell Sci. 115:2461–4.

Drury, K.C., and S. Schorderet-Slatkine. 1975. Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of Xenopus laevis. Cell. 4:269–74.

Dupré, A., C. Jessus, R. Ozon, and O. Haccard. 2002. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. EMBO J. 21:4026–36.

Eghbal, M.A., P.S. Pennefather, and P.J. O'Brien. 2004. H2S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. Toxicology. 203:69–76.

Ferrell, J.E., M. Wu, J.C. Gerhart, and G.S. Martin. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs. Mol. Cell. Biol. 11:1965–71.

Foster, M.W., M.T. Forrester, and J.S. Stamler. 2009. A protein microarray-based analysis of S-Nitrosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:18948–53.

Ghasemi, M., A.R. Dehpour, K.P. Moore, and A.R. Mani. 2012. Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. Biochem. Pharmacol. 83:1261–8.

Gurdon, J.B. 1974. Gene expression in early animal development: the study of its control by the microinjection of amphibian eggs. Harvey Lect. 49–69.

Guzmán, M.A., M.A. Navarro, R. Carnicer, A.J. Sarría, S. Acín, C. Arnal, P. Muniesa, J.C. Surra, J.M. Arbonés-Mainar, N. Maeda, and J. Osada. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. Hum. Mol. Genet. 15:3168–76.

Hochegger, H., A. Klotzbücher, J. Kirk, M. Howell, K. le Guellec, K. Fletcher, T. Duncan, M. Sohail, and T. Hunt. 2001. New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. Development. 128:3795–807.

Karaïskou, A., C. Jessus, T. Brassac, and R. Ozon. 1999. Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. J. Cell Sci. 112 (Pt 2:3747–56.

Karaiskou, A., A.-C. Leprêtre, G. Pahlavan, D. Du Pasquier, R. Ozon, and C. Jessus. 2004. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes. Development. 131:1543–52. doi:10.1242/dev.01050.

Kimura, H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267:129–33.

Kimura, H. 2013. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. Neurochem. Int. 63:492–7. doi:10.1016/j.neuint.2013.09.003.

Krejcova, T., M. Smelcova, J. Petr, J.-F. Bodart, M. Sedmikova, J. Nevoral, M. Dvorakova, A. Vyskocilova, I. Weingartova, V. Kucerova-Chrpova, E. Chmelikova, L. Tumova, and F. Jilek. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. PLoS One. 10.

Krishnan, N., C. Fu, D.J. Pappin, and N.K. Tonks. 2011. H2S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. Sci. Signal. 4:ra86.

Liang, R., W. Yu, J. Du, L. Yang, M. Shang, and J. Guo. 2006. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. Chin. Med. J. (Engl). 119:1877–83.

Liang, R., W.-D. Yu, J.-B. Du, L.-J. Yang, J.-J. Yang, J. Xu, M. Shang, and J.-Z. Guo. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. Reprod. Toxicol. 24:89–96.

Majumdar, U., P. Biswas, T. Subhra Sarkar, D. Maiti, and S. Ghosh. 2012. Regulation of cell cycle and stress responses under nitrosative stress in Schizosaccharomyces pombe. Free Radic. Biol. Med. 52:2186–200.

Masui, Y., and C.L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177:129–45.

Nagahara, N., M. Nagano, T. Ito, K. Shimamura, T. Akimoto, and H. Suzuki. 2013. Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. Sci. Rep. 3:1986. doi:10.1038/srep01986.

Oi, Y., M. Imafuku, C. Shishido, Y. Kominato, S. Nishimura, and K. Iwai. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. J. Nutr. 131:2150–6.

Du Pasquier, D., A. Dupré, and C. Jessus. 2011. Unfertilized Xenopus eggs die by Baddependent apoptosis under the control of Cdk1 and JNK. PLoS One. 6:e23672. doi:10.1371/journal.pone.0023672.

Patel, P., M. Vatish, J. Heptinstall, R. Wang, and R.J. Carson. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. Reprod. Biol. Endocrinol. 7:10.

Qu, K., S.W. Lee, J.S. Bian, C.-M. Low, and P.T.-H. Wong. 2008. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. Neurochem. Int. 52:155–65.

Reynhout, J.K., and L.D. Smith. 1974. Studies on the appearance and nature of a maturationinducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. Dev. Biol. 38:394–400.

Rime, H., D. Huchon, V. De Smedt, C. Thibier, K. Galaktionov, C. Jessus, and R. Ozon. 1994. Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into Xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. Biol. Cell. 82:11–22.

Rudolph, J. 2005. Redox regulation of the Cdc25 phosphatases. Antioxid. Redox Signal. 7:761–7.

Schmitt, A., G.J. Gutierrez, P. Lénárt, J. Ellenberg, and A.R. Nebreda. 2002. Histone H3 phosphorylation during Xenopus oocyte maturation: regulation by the MAP kinase/p90Rsk pathway and uncoupling from DNA condensation. FEBS Lett. 518:23–8.

Shibuya, N., M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasawara, T. Togawa, K. Ishii, and H. Kimura. 2009. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. Antioxid. Redox Signal. 11:703–714.

Sigel, E. 1990. Use of Xenopus oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. J. Membr. Biol. 117:201–21.

Soleymanlou, N., I. Jurisica, O. Nevo, F. Ietta, X. Zhang, S. Zamudio, M. Post, and I. Caniggia. 2005. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90:4299–308. doi:10.1210/jc.2005-0078.

Srilatha, B., P.G. Adaikan, L. Li, and P.K. Moore. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. J. Sex. Med. 4:1304–11.

Srilatha, B., P.G. Adaikan, and P.K. Moore. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction--a pilot study. Eur. J. Pharmacol. 535:280–2.

Srilatha, B., L. Hu, G.P. Adaikan, and P.K. Moore. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. J. Sex. Med. 6:1875–84.

Sugiura, Y., M. Kashiba, K. Maruyama, K. Hoshikawa, R. Sasaki, K. Saito, H. Kimura, N. Goda, and M. Suematsu. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. Antioxid. Redox Signal. 7:781–7.

Szabó, C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat. Rev. Drug Discov. 6:917–35.

Tokmakov, A.A., S. Iguchi, T. Iwasaki, and Y. Fukami. 2011. Unfertilized frog eggs die by apoptosis following meiotic exit. BMC Cell Biol. 12:56. doi:10.1186/1471-2121-12-56.

Tomko, R.J., and J.S. Lazo. 2008. Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress. Cancer Res. 68:7457–65.

Truong, D.H., M.A. Eghbal, W. Hindmarsh, S.H. Roth, and P.J. O'Brien. 2006. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. Drug Metab. Rev. 38:733–44.

Viry, E., A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diederich, and D. Bagrel. 2011. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. Int. J. Oncol. 38:1103–11.

Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J. 16:1792–8.

Wang, X.-B., J.-B. Du, and H. Cui. 2015. Signal pathways involved in the biological effects of sulfur dioxide. Eur. J. Pharmacol. 764:94–99.

Wasserman, W.J., and Y. Masui. 1975. Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic naturation in Xenopus oocytes. Exp. Cell Res. 91:381–8.

Yang, G., L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A.K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S.H. Snyder, and R. Wang. 2008. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science. 322:587–90.

Zhao, H., S.-J. Chan, Y.-K. Ng, and P.T.-H. Wong. 2013. Brain 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST): Cellular Localization and Downregulation after Acute Stroke. PLoS One. 8:e67322.

Zhou, Y., C. Ma, J. Karmouch, H.A. Katbi, and X.J. Liu. 2009. Antiapoptotic role for ornithine decarboxylase during oocyte maturation. Mol. Cell. Biol. 29:1786–95. doi:10.1128/MCB.01815-08.

Zhu, X.-Y., H. Gu, and X. Ni. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. Expert Rev. Clin. Pharmacol. 4:75–82.

Effet du NaHS sur la reprise de méiose et le développement précoce du xénope

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

1. Effet du GYY4137 sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope

Le NaHS et le GYY4137 ont été comparés pour leur action sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope. Pour cela, la reprise de méiose des ovocytes a été initiée par l'ajout de progestérone dans le milieu et les ovocytes ont été traités avec différentes concentrations de NaHS ou de GYY4137. Différents paramètres ont alors été observés :

- La cinétique d'apparition des taches de maturation des ovocytes et, lorsque cela était possible, la GVBD₅₀ qui correspond au temps nécessaire pour que 50% des ovocytes présentent une tache de maturation.
- Une étude cytologique visant à définir le stade exact dans lequel se trouvent les ovocytes. En effet, un ovocyte bloqué en prophase I ne présente pas les mêmes caractéristiques qu'un ovocyte ayant effectué sa GVBD (Figure 35).
- Une étude biochimique permettant d'étudier la mise en place de la cascade des MAPK et l'activation du MPF.



Figure 35 : Photos des différents stades pouvant être observés après coloration au rouge nucléaire des ovocytes de xénope. Les ovocytes en prophase I présentent une VG (Vésicule Germinative), qui se rompt par la suite, preuve de la GVBD. Apparait ensuite un premier fuseau, caractéristique des ovocytes en métaphase I. Les ovocytes en métaphase II présentent ce même fuseau, mais aussi un globule polaire, preuve de la fin de la méiose I.

Les ovocytes ont été traités par des concentrations croissantes de GYY4137 (100, 250, 500 μ M et 1 mM), directement ajoutées dans le milieu ND96. Le GYY4137 entraine un retard de l'entrée en phase M, attestée par la rupture de l'enveloppe nucléaire (Figure x). Après ajout de la progestérone, seuls 30 % des ovocytes traités par le GYY4137 montrent une tache de maturation contre 80 % des contrôles. La présence de GYY4137 inhibe également le taux final de cellules ayant effectué une reprise méiotique : 80% des cellules témoins présentent une tache de maturation contre 51,25%, 38,75%, 32,75% et 40,50% pour des concentrations respectives de 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M et 1 mM (Figure x). Après calcul des GVBD₅₀ (temps requis pour que 50% des ovocytes traités présentent une tache de maturation) pour chacun des traitements, nous observons que seule la concentration égale à 500 μ M provoque un retard de GVBD significatif (0,001<p<0,01) en comparaison des ovocytes contrôles.

D'un point de vue biochimique, les ovocytes traités par le GYY4137 montrent que Erk n'est jamais totalement phosphorylée, et que les concentrations croissantes de GYY4137 empêchent la phosphorylation de Rsk (absence de phosphorylation pour les ovocytes traités par 1 mM). Le

GYY4137 entraine un retard modéré de la transition G2/M des ovocytes de xénope lorsqu'il est utilisé à une concentration supérieure ou égale à 500 μ M. Une étude histologique préliminaire suggère qu'à faible concentration (100 μ M et 250 μ M) certains ovocytes sans tache de maturation auraient pourtant effectué leur GVBD.

Le NaHS, donneur rapide et transitoire d'H₂S, entraine un ralentissement de la transition G2/M des ovocytes de xénope et cela même à faible concentration (100 μ M). À forte concentration (5 mM), il entraine l'inhibition de cette transition. Le NaHS présentant des effets plus tranchés que le GYY4137, il a été utilisé comme donneur principal d'H₂S dans la suite des expériences.



2. Le NaHS entraine une inhibition de l'activité d'une Cdc25c humaine

Figure 36 : Dosage de l'activité d'une GST-Cdc25c humaine en présence de NaHS à différentes concentrations. L'activité Cdc25 a été dosée à l'aide de la technique colorimétrique OMFP basée sur le changement de couleur de la 3-OMFP lorsqu'elle est déphosphorylée. La GST-Cdc25c a été mise en contact du NaHS à différentes concentrations durant 15 minutes puis l'activité a été dosée.

Nous avons démontré précédemment que les effets du NaHS sur la maturation des ovocytes de xénope ciblent plutôt la boucle d'auto-amplification du MPF (article 2). Celle-ci comprend principalement le MPF et la phosphatase Cdc25c. Puisque le monoxyde d'azote est connu pour inhiber l'activité phosphatase de Cdc25 (Majumdar, Biswas et al. 2012), les effets de l'hydrogène sulfuré sur l'activité Cdc25c ont été étudiés par un test *in vitro*. Pour cela nous avons utilisé la méthode colorimétrique OMFP basée sur le changement de couleur qu'entraine l'activité phosphatase sur le 3-OMFP (3-O-Methylfluoresceine phosphate). De couleur initialement jaune, celui-ci devient bleu lorsqu'il est déphosphorylé en 3-O-Methylfluoresceine. Comme présenté dans la figure 36, l'activité phosphatase diminue de manière dépendant de la dose de NaHS. En condition contrôle, l'activité phosphatase diminue non significativement de 10%. À fortes concentrations de NaHS (1mM et 5 mM) l'activité de Cdc25 décroit à 0,42 (58%) et 0,26 (74%) respectivement.

3. Étude préliminaire des effets du NaHS sur la fécondation des ovocytes et le développement de têtards de xénope.

3.1. Le NaHS impact la fécondation des ovocytes de xénope

Les donneurs de H₂S présentent un effet positif sur le nombre d'ovocytes fécondés et le développement précoce des ovocytes de porc (article 3), l'effet du H₂S sur les embryons de xénope a été étudié. Des fécondations en présence de NaHS à différentes concentrations (100 μ M, 500 μ M et 1 mM) ont été effectuées et le pourcentage d'ovocytes fécondés a été relevé 45 minutes après fécondation. Le pourcentage a été relevé grâce à la rotation corticale. Dans la condition contrôle, 71,53% des ovocytes ont été fécondés. Ce pourcentage décroit en présence de NaHS aux différentes concentrations. Ces pourcentages sont 50,50% ; 41,60% et 43,23% pour les concentrations respectives de 100 μ M, 500 μ M et 1 mM. Cependant seule la concentration de 500 μ M est statistiquement significative, cependant il existe une forte tendance pour la concentration 1 mM (Figure 37).



Figure 37 : Effets du NaHS sur la fécondation. Pourcentages de fécondation obtenus en condition contrôle ou en présence de NaHS à différentes concentrations 45 minutes après mise en contact avec les spermatozoïdes. Le nombre d'ovocytes fécondés est comptabilisé grâce à la réaction corticale.

L'heure de passage des différents stades de l'embryogenèse a été relevée dans toutes les conditions. Ainsi le retard de passage des stades des différentes conditions NaHS par rapport à la condition contrôle a pu être calculé. Un retard important existe dès le début du stade 2 à la concentration 1 mM de NaHS. Ce retard se poursuit et se creuse progressivement. La concentration 1 mM NaHS atteint le stade 2 avec environ 25 minutes de retard sur la condition contrôle et ce délai passe à 83 minutes pour le passage du stade 6. Aucun retard significatif ne peut être vu pour d'autres concentrations (Figure 38).





3.2. Effet du NaHS sur le développement précoce des têtards de xénope

Une des expériences de fécondation ayant permis l'obtention de têtards de 6 jours. 3 têtards ont survécu en milieu contrôle (MMR) et 5 en condition NaHS à 100 μ M. A 6 jours de développement, il est admis que les structures cartilagineuses de l'embryon sont totalement formées. Ces stades ont été colorés au bleu alcian (spécifique du cartilage) et différents paramètres ont pu être ainsi analysés : longueur et largeur des têtards, taille de la tête, écartement des yeux et nombre de somites. Les données des têtards contrôles ou obtenus dans des milieux avec NaHS sont comparées afin de déterminer l'influence de l'H2S sur le développement des larves.

Des photos des têtards ont été obtenues sur un microscope inversé (collaboration avec l'équipe TISBio : Traitement de l'Image et du Signal pour la Biologie) et ont permis l'étude de différents paramètres à l'aide du logiciel Image J et de scripts de détection d'éléments précis (tel que les yeux ou la longueur totale du têtard) développés par Corentin Spriet dans le cadre du M2 recherche de Sylvain Slaby. Plusieurs différences ont pu être observées entre les têtards contrôles et les têtards traités au NaHS. Les têtards contrôles étaient plus petits que ceux obtenus dans un milieu contenant 100µM de NaHS. En effet, les têtards contrôles MMR font en

moyenne 7,36 mm +/- 0,06 mm contre 9,79 mm +/- 0,26 mm. Certains des têtards NaHS montrent une plicature de leur chorde (Figure 39).



Figure 39 : Exemple de têtard à 6 jours colorés au bleu alcian. (A) Têtard de 6 jours ayant effectué son développement dans un milieu contrôle MMR (objectif 1X). (B) Têtard de 6 jours ayant effectué son développement dans un milieu contenant 100 μ M de NaHS (objectif 0,75 X). Le NaHS est renouvelé toutes les 24h. Les flèches noires désignent les intestins, les flèches oranges les yeux s'ils sont présents. Axe antéro-postérieur (A-P) et dorsaux-ventral (D-V) indiqué par des doubles flèches. Les barres noires correspondent à une échelle de 1 mm. N = 3 en condition contrôle N = 5 en présence de 100 μ M de NaHS.



Figure 40 : Exemple de tête de têtard à 6 jours colorés au bleu alcian. (A) Tête de têtard de 6 jours ayant effectué son développement dans un milieu contrôle MMR (Objectif 3X). (B) (C) Têtes de têtards de 6 jours ayant effectué leur développement dans un milieu contenant 100 μ M de NaHS. Le NaHS est renouvelé toutes les 24h (Objectif 3X). N = 3 en condition contrôle N = 5 en présence de 100 μ M de NaHS.

S'il n'existe pas de différence dans la taille de la tête des têtards, on remarque des malformations de la tête des têtards ayant effectué leur croissance en NaHS (100 μ M). On observe aussi des malformations voir une absence totale des yeux (Figure 38). En moyenne l'écart entre les yeux des têtards contrôles est de 1,12 mm +/- 0,05 mm contre 1,20 mm +/- 0,019 mm pour les têtards ayant effectué leur développement dans 100 μ M de NaHS. Les branchies et les tubes digestifs des têtards des deux conditions ne présentent pas de différences et semblent se mettre correctement en place (figure 41).



Figure 41 : Exemple de branchie et intestins de têtards colorés au bleu alcian. (A) Branchies de têtard de 6 jours ayant effectué son développement dans un milieu contrôle MMR (Objectif 3X). (B) Tête de têtard de 6 jours ayant effectué son développement dans un milieu contenant 100 μ M de NaHS. Le NaHS est renouvelé toutes les 24h (Objectif 3X). Les branchies sont pointées par une flèche jaune. N = 3 en condition contrôle N = 5 en présence de 100 μ M de NaHS.

4. Étude des effets du NaHS sur la transition G2/M du cycle cellulaire en cellules du cancer du sein (MCF-7).

La lignée MCF-7 a été choisie car il a été observé que le GYY4137, un donneur lent de H_2S , était capable d'entrainer un arrêt partiel lors de la transition G2/M dans cette lignée de cancer du sein (Lee et al., 2011). Ainsi cette lignée paraissait être un choix intéressant afin d'étudier les effets du H_2S sur les cibles du cycle cellulaire définies dans l'étude portant sur la maturation de l'ovocyte de xénope, phénomène analogue à la transition G2/M du cycle cellulaire.

4.1. Recherche des concentrations de NaHS.

De nombreuses concentrations de NaHS (de 10 μ M à 5 mM) ont été testées afin de déterminer si un arrêt dans le cycle des cellules des MCF-7 pouvait être induit sans entrainer de mort cellulaire par apoptose. Les analyses ont été réalisées par cytométrie en flux (FACS). L'apoptose a été vérifiée lors de la préparation des échantillons par l'utilisation de bleu trypan puis par la présence de cellules en sub-G1 lors de l'analyse en FACS.

Dès la concentration de 250 μ M de NaHS, une forte quantité de cellules en sub G1 était observée à 48h de traitement. Les études suivantes ont donc été effectuées à des concentrations plus faibles (<100 μ M).



Figure 42 : Quantificatif du nombre de cellules / mL en présence de NaHS à différents temps. Les cellules, traitées ou non au NaHS à différentes concentrations (50, 75 et 100 μ M) ont été comptées sur lame de Malassez à différents temps après ajout du NaHS (24, 48 et 72h). Le nombre de cellules mortes a été compté suite à une coloration au bleu trypan.

Les concentrations de 50 μ M, 75 μ M et 100 μ M ont finalement été retenues car entrainant une faible mort cellulaire lors de l'étude des cellules en bleu trypan. On observe une augmentation du nombre de cellules au cours du temps. Dans la condition contrôle le nombre de cellules passe de 25333,33 cellules / mL à 24h à 67666,67 cellules / mL à 72h. La mort cellulaire la plus forte est observable au temps 72h en présence de NaHS 75 μ M où 4666 cellules / mL sont mortes sur les 35666 cellules / mL totales soit 13% des cellules totales. On peut remarquer que le nombre de cellules décroit de façon dépendante de la dose en présence de NaHS en comparaison au contrôle non traité (Figure 42).

4.2. Les concentrations de NaHS n'entrainent pas un arrêt marqué dans le cycle cellulaire

Les cellules MCF-7 ont été traitées à ces différentes concentrations durant 24h ou 48h puis préparées afin d'étudier leur répartition dans le cycle cellulaire par une analyse en cytométrie de flux. Afin de ne pas entrainer un arrêt dans le cycle du à l'épuisement du milieu en sérum, le milieu était renouvelé et du NaHS neuf ajouté toutes les 24h. Trois expériences, sur trois semaines consécutives, ont été réalisées. L'étude du cycle ne révèle pas d'arrêt spécifique marqué des cellules dans une phase du cycle. On observe tout de même une augmentation du pourcentage de cellules en G1 à 48h dans la seconde expérience. En effet, 55,26% de cellules sont en G1 dans les conditions témoins à 48h contre 55,13% ; 68,51% et 73,85% en présence de 50 μ M, 75 μ M et 100 μ M de NaHS respectivement. Cependant dans les autres expériences cette augmentation du nombre de cellules en phase G1 n'est pas observable. Aucune augmentation du pourcentage de cellules en phase G2 n'est observable dans aucune de ces expériences. Ces résultats vont donc à l'encontre des études précédentes ayant démontré un arrêt partiel de cette lignée cellulaire en G2/M en présence d'un donneur lent de H₂S, le GYY4137 (Lee et al., 2011).



Figure 43 : Profil de libération du H₂S par le GYY4137 comparativement au NaHS et à un autre analogue non soufré le ZYJ1122 (Lee et al., 2011). L'ensemble des composés est utilisé à la même concentration (400 μM).

Cet arrêt en phase G1 pourrait s'expliquer par une inhibition de contact des cellules bien que celles-ci ne soient pas à confluence après observation au microscope. Cependant les MCF-7 sont connues pour pousser en amas, entrainant la formation de clones. La présence d'un trop grand nombre de clones peut provoquer un arrêt en phase G1 des cellules. Dans la publication de Lee et al, de 2011, le GYY4137 était utilisé à une concentration de 400 μ M. Notre concentration maximale de NaHS étant de 100 μ M, elle est 4 fois inférieure à la concentration de GYY4137 de l'étude de Lee et coll. Bien qu'il soit connu qu'à cette concentration, le NaHS libère une quantité de H₂S jusqu'à 100 fois supérieure au GYY4137 (Figure 43) nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que nos cellules soient mises en contact d'une plus grande quantité de H₂S que dans les études prélimaine.

4.3. L'utilisation de NaHS sur les cellules MCF-7 ne modifie pas leur profil biochimique.

Le clivage de la caspase 3, signe d'apoptose, ainsi que l'état de phosphorylation de Cdc25c ont été étudiés par immuno-empreinte.

Aucun clivage de la caspase n'a été observé dans l'ensemble des conditions étudiées. Les cellules ne présentent donc pas un profil apoptotique en présence de NaHS, quel que soit le temps d'incubation ou la concentration utilisée. Cela nous indique par la même occasion que les cellules ne sont pas entrées en apoptose en présence des concentrations de NaHS testées. De même, la phosphorylation de Cdc25c ne semble pas être touchée par la présence de NaHS. Le Cdc25c est détecté phosphorylé comme non phosphorylé dans toutes les conditions (Figure 44). Il ne semble donc pas y avoir d'effet du NaHS, aux concentrations testées, sur la biochimie des cellules de la lignée MCF-7.



Figure 44 : Le NaHS ne perturbe pas la biochimie des cellules MCF-7. Immuno-empreintes de Cdc25c, de ERK et de la caspase 3 réalisées à partir d'extraits protéiques de cellules MCF-7 traités ou non (Ctrl) au NaHS à différentes concentrations. Les cellules ont été incubées 24 ou 48h en présence du donneur de H₂S.

5. Étude la S-Sulfhydration des protéines en présence de NaHS.

La S-Sulfhydration des protéines a été étudiée par le biais d'un biotin-switch modifié. Cette méthode est dérivée d'un protocole permettant la détection des protéines nitrosylées. Le protocole consiste à convertir les cystéines s-sulfhydrées en cystéine biotinilées pouvant être purifiées par l'interaction steptavidine/biotine et pouvant être détectées par simple immuno-empreinte.



Figure 45 : S-Sulfhydration des protéines totales. Les cellules MCF-7 ont été traitées ou non au NaHS à différentes concentrations durant 24 ou 48h. Les cellules T₀ correspondent aux cellules récupérées après 24h de culture sans traitement. Les protéines totales sont extraites puis les protéines S-Sulfhydrées sont isolées *via* un protocole biotine-switch modifié. L'ensemble de ces protéines S-Sulfhydrées a ensuite été révélé par un anticorps anti-biotine.

L'utilisation d'un anticorps anti-biotine sur des extraits totaux a permis de mettre en évidence les protéines S-sulfhydrées d'extraits protéiques préparés à partir des cellules MCF-7 traitées ou non au NaHS à différentes concentrations. La majorité des protéines S-sulfhydrées se trouvent entre 50 et 75 Kda avec deux bandes majeures. De même, deux bandes se trouvant entre 25 et 37 Kda sont visibles. Alors que l'on pourrait s'attendre à observer une augmentation de la S-Sulfhydration de façon dépendante de la dose, il n'en est rien. En effet, les conditions présentant les bandes les plus fortes, témoins d'une forte S-Sulfhydration, sont les conditions 75µM de NaHS à 24h et le contrôle ainsi que les concentrations 50µM et 100µM de NaHS à 48h (Figure 45). Cela pourrait s'expliquer par une différence dans les concentrations de protéines déposées dans les puits au moment de l'électrophorèse. D'autres expériences sont à réaliser afin d'affiner ces résultats. Par exemple, il serait intéressant d'utiliser une condition dans laquelle le métabolisme du H₂S est inhibé afin d'écarter un problème de spécificité des anticorps. D'autres tests seront effectués sur des ovocytes de xénope, modèle où les concentrations en NaHS peuvent être augmentées de façon drastique et où les effets du H₂S sont visibles.



Cdc25c (53 Kda)

Figure 46 : S-Sulfhydration de la protéine Cdc25c. Les cellules MCF-7 ont été traitées ou non au NaHS à différentes concentrations durant 24 ou 48h. Les cellules T₀ correspondent aux cellules récupérées après 24h de culture sans traitement. Les protéines totales sont extraites puis les protéines S-Sulfhydrées sont isolées pour un protocole biotine-switch modifié. La S-Sulfhydration de la protéine Cdc25c a donc pu être étudiée *via* sa présence en immuno-empreinte, en utilisant un anticorps anti-Cdc25c sur ces extraits protéiques.

La S-Sulfhydration de la protéine Cdc25c a ensuite été étudiée. Il existe une S-Sulfhydration basale de la protéine puisque celle-ci peut être détectée à T_0 (cellules sans traitement). À 24h, la S-Sulfhydration de la protéine augmente pour devenir maximale à 75µM de NaHS. Cependant la S-Sulfhydration de la protéine ne baisse pas dans la condition contrôle 48h (Figure 46). Il se peut donc que la S-Sulfhydration observée dans les conditions NaHS ne soit pas due au relargage de H₂S ou que les bandes observées en fin de protocole ne soient pas témoins de la S-Sulfhydration de la protéine. Des conditions contrôles ne présentant aucune S-Sulfhydration possible, comme l'utilisation de protéine BSA, pourraient permettre de vérifier que les bandes observées témoignent bien d'une S-Sulfhydration de la protéine.

De même, on peut expliquer cette augmentation de la S-Sulfhydration à 48h par un stress cellulaire. En effet, on sait que la S-Sulfhydration intervient dans différents type de stress cellulaire comme le stress redox ou le stress du reticulum endoplasmique (Paul and Snyder, 2012).
Effets du NO sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope

Publication 2: Nitric oxide donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) alters meioticspindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes

Gelaude A¹, Marin M¹, Cailliau K¹, Jeseta M², Lescuyer-Rousseau A¹, Vandame P¹, Nevoral J², Sedmikova M², Martoriati A¹, Bodart JF¹.

J. Cell. Biochem. 2015

¹Université Lillel, Sciences et Technologies, Régulation des Signaux de Division Team, UMR 8576 CNRS, FR3688 CNRS, Villeneuve dAscq, France.

²Czech University of Life Sciences in Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Veterinary Sciences, Prague, Czech Republic.

1. Contexte

La présence des enzymes responsables de la production du monoxyde d'azote (NO) au niveau des tissus reproducteurs de mammifère tels que les testicules, l'épididyme (Zini, 1996), les ovaires (Van Voorhis et al., 1995; Klimp et al., 2001) et l'utérus (Telfer et al., 1995) a ouvert la voie aux études sur l'importance que ce gazotransmetteur revêt dans ces tissus. De nombreux articles, portant majoritairement chez le rat et dans les ovocytes porcins se sont intéressés à l'implication du NO sur l'ensemble des phénomènes de l'ovogenèse, de la maturation des ovocytes (Chmelíková et al., 2010; Jablonka-Shariff and Olson, 1998; Sengoku et al., 2001) et de l'ovulation (Jablonka-Shariff and Olson, 1998; Nakamura et al., 2002; Zakhary et al., 1997; Zackris et al., 1996), sans oublier l'effet de ces gazotransmetteurs sur la grossesse ou la gestation elle-même (Review: Maul et al. 2003). De la création des gamètes à leur émission, jusque la formation de l'embryon, le monoxyde d'azote semble jouer un rôle dans l'ensemble des processus qui forment un nouvel être.

2. Objectifs

Une précédente étude de notre équipe a démontré qu'un donneur de NO, le SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine), permettait la reprise de méiose à partir du second blocage physiologique en métaphase II de l'ovocyte de xénope (Jeseta et al., 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus précisément aux effets du NO sur les étapes précoces de la méiose (entre les blocages en prophase I et en métaphase II), de l'ovocyte de xénope (mécanismes moléculaires de régulation du cycle cellulaire et morphogenèse du fuseau). L'ensemble de cette étude a eu pour but d'explorer les mécanismes impliquant le NO dans la méiose des vertébrés, chez le xénope.

3. Le SNAP, perturbateur de la reprise de méiose

3.1.Choix du donneur de NO

De nombreux donneurs de NO existent dans la littérature. Une étude des effets du NO sur l'activation des ovocytes de xénope a permis de sélectionner le SNAP comme étant un donneur de NO efficace sur notre modèle. Deux autres donneurs sont, en effet, majoritairement cités dans la littérature : le NOR 5, un agent qui va produire du NO sur un temps long (le temps de demi-vie de production de NO est de 20h), mais en faible quantité et le SNP un donneur plus rapide. Il est à noter que le SNP est utilisé dans le traitement clinique d'un certain nombre de maladies comme, la sténose aortique (Ikram et al., 1992), l'erythromelalgia (Chan et al., 2002), les varices œsophagiennes (Sirinek et al., 1989), les acidoses lactiques (Taradash and Jacobson, 1975), l'infarctus du myocarde (Yusuf et al., 1988), et l'hypertension pulmonaire (Knapp and Gmeiner, 1977). Ces 2 donneurs ont été écartés car ils permettent des taux de libération de NO moins élevés que ceux observés avec le SNAP (Figure 47). De plus, la production d'ions CN₂ pourrait être à l'origine d'effets secondaires (cas du SNP). Enfin, leur pénétration cellulaire est inférieure à celle du SNAP (Jeseta et al. 2012).





Figure 47 : Libération de NO par différents donneurs à différentes concentrations. La quantité de NO produite par les différents donneurs a été mesurée à l'aide du « Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Assay » (Thermofisher) qui permet la quantification de la concentration de monoxyde d'azote dans les surnageants de culture cellulaire, le sérum, le plasma et les urines. Ce dosage détermine la concentration de monoxyde d'azote en se basant sur la reconversion enzymatique du nitrate en nitrite par la nitrate reductase. La concentration est déterminée de façon colorimétique par détection du nitrite par la réaction de Griess. La réaction de Griess est basée sur la réaction de diazotation en deux étapes dans laquelle le NO_2 - acidifié produit un agent de nitrosation qui réagit avec de l'acide sulfanilique pour produire l'ion diazonium. Cet ion est ensuite couplé à la N-(1 -naphtyl)-éthylènediamine pour former le dérivé azo-chromophore qui absorbe la lumière à 540-570 nm (Boo et al., 2007).

Puisque le SNAP avait des effets intéressants sur l'activation des ovocytes de xénope, nous l'avons également utilisé pour étudier son effet sur la maturation, évènement déterminant de la préparation de l'ovocyte à la fécondation.

3.2.Le SNAP perturbe les évènements moléculaires et cellulaires de la reprise de méiose La reprise de méiose, analogue à la transition G2/M des cellules somatiques, est caractérisée par la GVBD (Germinal Vesicle Break Down) et la formation d'un premier fuseau méiotique dont l'ancrage à la membrane plasmique entraine l'apparition d'une tache de maturation (ou white spot). Une seconde division s'engage immédiatement, entrainant l'apparition d'un globule polaire et la formation d'un second fuseau (Bodart et al., 2002a). Les fuseaux typiques des ovocytes de xénope sont caractérisés par leur position perpendiculaire à la membrane plasmique et l'alignement des chromosomes sur une plaque métaphasique.

Un donneur de NO, le SNAP, a été utilisé sur des ovocytes dont la reprise de méiose a été induite soit par la progestérone, soit par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures (contenant du MPF actif) dans des ovocytes immatures. En effet, lorsqu'une faible quantité de

MPF actif est injectée dans un ovocyte en prophase I, ce MPF active Cdc25 par phosphorylation. Puis Cdc25, à son tour, active le pré-MPF, stock inactif de MPF, en déphosphorylant les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de Cdc2 (Hoffmann et al., 1993; Strausfeld et al., 1994). Cette boucle est indépendante de toute synthèse protéique et permet une reprise de méiose plus rapide que celle induite par les hormones stéroïdes (Masui and Markert, 1971; Wasserman and Masui, 1975). Les ovocytes obtenus en fin de cinétique pour ces deux expériences ont été étudiés d'un point de vue biochimique et cytologique afin de vérifier la mise en place des voies de signalisation impliquées dans la maturation, et de constater, au niveau cellulaire, l'établissement d'un fuseau bipolaire normalement positionné à la membrane plasmique, ainsi que l'extrusion du premier globule polaire.

Nos résultats montrent qu'en présence du donneur de NO, le nombre d'ovocytes présentant une tache de maturation est réduit, dépendamment de la dose, et quelle que soit la méthode d'induction de la reprise de méiose utilisée (progestérone ou micro-injection de cytoplasme) (Article 2, Figure 1 et 3).

Les états de phosphorylations de Erk, de Rsk, du résidu Tyrosine 15 de Cdc2 et de l'Histone H3 ont été déterminés par immuno-empreinte sur ovocyte individuel. La présence d'une phosphorylation en Tyrosine 15 de Cdc2 révèle l'état inactif du MPF, attestant que les ovocytes sont bloqués en prophase I. Lorsque le MPF est actif, il phosphoryle l'Histone H3, une de ses nombreuses cibles. Cette expérience a révélé des différences entre ovocytes d'une même série, dans la mise en place de la voie MAPK et l'activation du MPF. Comparés de façon individuelle, les ovocytes d'une même expérience présentaient des profils hétérogènes pour les différentes protéines étudiées en immuno-empreinte. Pour la protéine Erk, par exemple, différents profils de phosphorylation ont été retrouvés au sein de la même population. Cependant, bien que ces ovocytes présentent des profils biochimiques différents, la majorité des ovocytes présente une phosphorylation de l'Histone H3 (voie MPF active) et une cascade MAPK active malgré l'absence de signe morphologique de reprise de méiose (pas de tache de maturation) (Article 2, Figure 2). Cette inconstance de l'activation des voies de signalisation entre ovocytes souligne que le NO perturbe le profil biochimique. Plus qu'une perturbation des voies biochimiques, et donc une absence de reprise de méiose, il semble que le SNAP entraine une inhibition de l'apparition de la tache de maturation.

Des coupes d'ovocytes ont été colorées au rouge nucléaire et au picroindigo carmin afin d'analyser la morphologie des fuseaux de division. Deux phénomènes ont été mis en avant. Dans un premier temps, il a été démontré que plus la concentration en SNAP est élevée, plus les ovocytes s'arrêtent précocement après leur reprise de méiose, que celle-ci soit induite par la progestérone ou par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures. Il a aussi été observé que plus la concentration en SNAP était élevée, plus la quantité de fuseaux atypiques augmentait (Article 2, Tableau 1 et 2). Ces fuseaux sont majoritairement ectopiques, non ancrés à la membrane, et présentent des chromosomes désorganisés non alignés sur la plaque métaphasique.

3.3.Les effets du SNAP dépendent-ils d'une variation de pHi?

Des travaux précédents effectués dans notre équipe ont démontré que des modifications du pH externe affectent la reprise de méiose des ovocytes de xénope. Lors de la reprise de méiose, se produit une alcalinisation transitoire de 0,2-0,4 unités pH (Lee and Steinhardt, 1981). Si le pH intracellulaire est tamponné par une injection de tampon MOPS pH 6,9, la migration de la vésicule germinative est inhibée : les structures qui se forment sont principalement localisées au centre de la cellule (Flament et al., 1996). De même, l'acidification intracellulaire est associée à une altération du positionnement du fuseau méiotique et de sa morphogenèse (Flament et al., 1997; Sellier et al., 2006; Rodeau et al., 2009). Le SNAP étant capable d'induire une acidification du milieu, nous avons testé l'hypothèse que cette acidification explique l'effet du donneur du NO sur la mise en place des fuseaux et la reprise de méiose.

Afin d'étudier si les effets du SNAP sur la reprise de méiose sont dus à l'acidification du milieu, une cinétique en présence de NaOH a été effectuée. Dans ces expériences, le pH du milieu ND96 est de 7,4. Un pH identique sera restauré à l'aide de NaOH dans le cas d'ajout de SNAP. En présence du donneur de NO à la concentration de 2,5 mM, le pH mesuré dans le milieu descend à 4 et la reprise de méiose est bloquée (pas de tache de maturation). Cette dernière est restaurée lorsque le pH est rétabli à 7,4 par le NaOH. Ces résultats montrent que le pH acide causé par le SNAP inhibe spécifiquement l'apparition de la tache de maturation. *A contrario*, même si le pH est restauré à 7,4 dans un milieu SNAP, les fuseaux observés restent atypiques. Ces observations suggèrent que les effets du SNAP sur l'assemblage du fuseau sont indépendants de la variation de pH et ne dépendraient que de la libération de NO (Article 2, Figure 4).

3.4.L'altération de la morphogenèse du fuseau méiotique, un effet spécifique de l'augmentation de NO

Afin de confirmer que les effets du SNAP sur la morphogenèse du fuseau étaient bien engendrés par la libération de NO, des cinétiques de maturation en présence de NAP N-Acetyl-D,L-penicillamine disulfide (NAP) ont été réalisées.

Le NAP est un produit de dégradation du SNAP. Fondamentalement, le NAP a les mêmes caractéristiques moléculaires que le SNAP, mais ne libère pas de NO. Il est utilisé dans plusieurs publications comme témoin pour l'étude de la toxicité du SNAP (Bourdon et al., 2003; Babich et al., 1999; Chen et al., 2005b). En présence de NAP à une concentration de 2,5mM, la formation des fuseaux n'est pas perturbée. Ces résultats démontrent que la formation du fuseau est perturbée en présence de NO (Article 2, Figure 5).

L'ensemble de ces résultats indique que la production de NO par le SNAP serait capable de perturber les protéines du cytosquelette. En effet, ces protéines sont impliquées dans la morphogenèse du fuseau, notamment par des interactions entre les MAPs (Microtubule Associated Protein), les protéines motrices du cytosquelette et les microtubules. Il a été montré dans d'autres modèles que le NO entrainait la S-nytrosilation de certaines de ces protéines (*Arabidopsis Thaliania* : Greco et al. 2006 ; cellules musculaires lisses : Lindermayr et al. 2005). Ainsi, on peut supposer que la perturbation de la mise en place du fuseau lors de la maturation des ovocytes de xénope induite par le SNAP pourrait être liée à une S-nytrosilation de protéines du cytosquelette impliquées dans ce phénomène.

Effets du NO sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope

PUBLICATION 2

Nitric oxide donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) alters meiotic spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes.

Gelaude A¹, Marin M¹, Cailliau K¹, Jeseta M², Lescuyer-Rousseau A¹, Vandame P¹,

Nevoral J², Sedmikova M², Martoriati A¹, Bodart JF¹.

J Cell Biochem. 2015

Title : Nitric oxide donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) alters meiotic spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes

Authors Armance Gelaude¹, Matthieu Marin¹, Katia Cailliau¹, Michal Jeseta², Arlette Lescuyer-Rousseau¹, Pauline Vandame¹, Jan Nevoral³, Marketa Sedmikova³, Alain Martoriati^{1,@} and Jean-François Bodart^{1,*@}.

¹Université Lille1, Sciences et Technologies, Régulation des Signaux de Division Team, UMR 8576 CNRS, Villeneuve d'Ascq, France. ²Veterinary Research Institute, Brno · Genetics and Reproduction, Brno, Czech Republic ³Czech University of Life Sciences in Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Veterinary Sciences, Prague, Czech Republic.

@ Co-authors

* Corresponding author : Bodart Jean-François, UMR 8576 CNRS, Room 307, Building SN3, Université de Lille, Cité Scientifique, F-50655 Villeneuve d'Ascq France, Te. 33 3 20 43 68 67, Fax : 33 3 20 43 69 10. mail: jean-francois.bodart@univ-lille1.fr

RUNNING TITLE : SNAP alters meiotic spindle

KEY WORDS : Nitric Oxide, Meiosis, Xenopus, Spindle, Oocyte.

TOTAL NUMBER OF TEXT FIGURES & TABLES : 5 FIGURES AND 2 TABLES (NOT INCLUDING SUPPLEMENTARY MATERIAL).

Abstract:

Together with the gasotransmitters carbon monoxide (CO) and hydrogene sulfide (H₂S), the short-lived endogenously produced nitric oxide (NO) is a key player mediator in various molecular cascades. NO has been involved in both intra and extra-cellular signaling pathways in a wide variety of organisms, and can be detected in some reproductive tissues. Based upon previous results reporting that NO-donor SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine) promoted the release from the metaphase II-anaphase II block in amphibian eggs, our aim was to assess the influence of SNAP on the activation of the molecular mechanisms triggering meiotic resumption of Xenopus oocytes, analogous to G2/M transition of the cell cycle. In our hands, the high concentration of SNAP (2.5 mM) inhibited the appearance of the white spot and promoted alteration of spindle assembly leading to atypical structures lacking bipolarity and correct chromosomes equatorial alignment. The acidification (pH=4) promoted by SNAP specifically impacted the white spot appearance. But, even if pH was restored to 7 in SNAP medium by using NaOH (1 M), spindles observed were atypical suggesting an effect of SNAP on spindle assembly being independent upon pH effects. Using N-Acetyl-D,L-penicillamine disulfide (NAP: 2.5 mM), a degradation product of SNAP with the same molecular characteristics without NO releasing, spindle assemblies were correct suggesting the specificity of NO action on spindle morphogenesis alteration.

Introduction

Together with the gasotransmitters carbon monoxide (CO) and hydrogene sulfide (H₂S), the short-lived endogenously produced nitric oxide (NO) is a key player mediator in signaling pathways. Initially identified as an endothelium-derived relaxing factor (Palmer et al., 1987), NO is generated by nitric oxide synthases (NOS) and has been involved in the mediation of both intra and extra-cellular signaling pathways in a wide variety of organisms, ranging from yeasts, plants to vertebrates (Hess and Stamler, 2012; Majumdar et al., 2012). It is involved in numerous physiological processes in immune, cardiovascular and nervous systems (Kröncke et al., 1995; Napoli and Ignarro, 2009; Gross and Wolin, 1995). In contrast to other signaling molecules, NO acts through a quite wide range of chemical reactions, which depends upon contexts and subtle changes in both intra and the extracellular media (Moncada et al., 1991). Thus, NO effects remain complex to untangle.

Noticeably, NOS has been detected and isolated within mammalian reproductive tissues like testis, epididymis, ovaries and uterus, therefore underlying a potential physiological role in reproduction processes: follicular growth and ovulation in mouse (Sengoku et al., 2001), meiosis progression in mice, pigs and *xenopus* (Sengoku et al., 2001; Chmelíková et al., 2010; Jeseta et al., 2012), embryo implantation in rats (Biswas et al., 1998), and spermatogenesis in human. Though suggesting that NO might exert its effects through evolutionary conserved mechanisms (Zini et al., 1996), the collected data in different above-mentioned species did not discard the hypothesis that requirement for NO might differs from a specie to another, or depend on the nature of the NO donor.

Further than the reported role for NO during cell cycle transition during meiosis (Sengoku et al., 2001; Chmelíková et al., 2010; Jeseta et al., 2012), a particular interest of the role for NO and its derivative was addressed during the cell cycle progression. Cell cycle control is a cancerrelated event reported to be modulated by NO such as angiogenesis, invasion and metastasis (Ying and Hofseth, 2007). Nevertheless, several lines of evidence have shown that NO acted either like a friend or a foe toward cell cycle, in a dual manner as it does for cancer, exerting tumor promoting effects as well as anti-tumoral effects (Choudhari et al., 2013). For example, the NO-donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) was previously reported to prevent cell cycle progression in many cell types: cerebellar glial cells (Garg et al., 1992), BALB/C 3T3 fibroblasts (Garg and Hassid, 1990), endothelial cells (Sarkar et al., 1995), human airway smooth muscle cells (Hamad et al., 1999), lymphocytes(Kosonen et al., 1998), chick embryo retina glial cells (Magalhães et al., 2006), GH3 cells (Tian et al., 2010) and breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF7 (Laudański et al., 2001). By contrast, myoblasts were either stimulated or prevented in their proliferation, emphasizing the duality of NO towards cell proliferation (Ulibarri et al., 1999). Molecular studies on these effects have been focused on the G1-S phase transition because NO was more likely to arrest cells at the border of S phase, through the inhibition of the Cdk2/Cyclin A complex: Cdk2 expression was not altered while Cyclin A expression was repressed at the promotor level in vascular smooth cells (Guo et al., 1998; Sharma et al., 1999). Furthermore, Cdk2 itself was inhibited by the expression of the Cdk Inhibitor p21^{sdi1/Cip/Waf1}(Tanner et al., 2000). Finally, in breast cancer cell lines MDA-MB-231, increasing NO levels by the use of NO donors blocks cell cycle in G1, through the inhibition of Cyclin D1 expression, and the maintenance of pRb hyperphosphorylation (Pervin et al., 2001). Therefore, strategies promoting either NO release or tempering and/or scavenging NO have become of special interest in cancer cell lines.

However, less interest has been put on the role of NO during cell division itself, at a non genomic level. Based upon previous results reporting that NO-donor SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine) promoted the transgression of the metaphase-anaphase block in amphibian eggs (Jeseta et al., 2012), we undertook to analyze its effects during meiosis. In amphibian oocytes, meiosis is a cell division process through which a diploid cell undergoes through two successive divisions without replication or depending upon transcription, to produce haploid cells, namely oocytes and polar bodies. Vertebrates oocytes are arrested in prophase of the first meiotic division (PI), resume meiosis in response to hormonal stimulation, in a process called maturation, and are stopped at metaphase of the second division, in anticipation to fertilization (Bodart et al., 2002a). Release from prophase I, which is analogous to a G2/M transition, is characterized by the organization of a microtubules array pushing the germinal vesicle towards the apex of the animal cortex. The breakdown of the nuclear envelope (GVBD, Germinal Vesicle Break Down) is followed by chromosomes condensation and organization of a bipolar spindle at the plasma membrane. Anchoring of this spindle at the cortex is accompanied by the appearance of a white spot at the apex of the oocyte. Then, a second meiotic division begins without replication, after the extrusion of the first polar body, but immediately stops at metaphase (Hausen and Riebesell, 1991). These conditions enable to analyze the effect of compounds independently of their genotoxicity, since the onset of meiosis and the progression through the maturation process are independent of transcription (Bodart et al., 2002). Thus, such cellular context offer the opportunity to evaluate morphological alteration of spindle (Bodart et al., 2005), a structure crucial to genomic material segregation, that directly impacts on the molecular mechanisms driving meiosis. At the molecular level, MPF (Meiotic or M-Phase Promoting Factor), being an universal factor, promotes M-phase entry during mitosis or meiosis, and is made up of a catalytic subunit, Cdk1, and a regulatory sub-unit, Cyclin B (Norbury and Nurse, 1990). The activity of this heterodimer is regulated by inhibitory phosphorylation on Thr14 and Tyr15, achieved by Wee1 and Myt1 kinases (Fattaey and Booher, 1997) and by regulating the level of Cyclin B, which can be degraded through the ubiquitin pathway (Rolfe et al., 1997). MAPK xp42Mpk1 (Ferrell et al., 1991) is activated at the same time than MPF, and plays a crucial role in the establishment of the meiotic spindle (Bodart et al., 2005) and the inhibition of replication between the two meiosis divisions (Dupré et al., 2002).

Noticeably, NOS has been detected and isolated within mammalian reproductive tissues like testis, epididymis, ovaries and uterus, therefore underlying a potential physiological role in reproduction processes: follicular growth and ovulation in mouse (Sengoku et al. 2001), meiosis progression in mice, pigs and xenopus (Sengoku et al. 2001; Chmelíková et al. 2010; Jeseta et al. 2012), embryo implantation in rats (Biswas et al. 1998), and spermatogenesis in human. Though suggesting that NO might exert its effects through evolutionary conserved mechanisms (Zini et al. 1996), the collected data in different above-mentioned species did not discard the hypothesis that requirement for NO might differs from a specie to another, or depend on the nature of the NO donor.

Further than the reported role for NO during cell cycle transition during meiosis (Sengoku et al. 2001; Chmelíková et al. 2010; Jeseta et al. 2012), a particular interest of the role for NO and its derivative was addressed during the cell cycle progression. Cell cycle control is a cancerrelated event reported to be modulated by NO such as angiogenesis, invasion and metastasis (Ying & Hofseth 2007). Nevertheless, several lines of evidence have shown that NO acted either like a friend or a foe toward cell cycle, in a dual manner as it does for cancer, exerting tumor promoting effects as well as anti-tumoral effects (Choudhari et al. 2013). For example, the NO-donor S-nitroso-N-acetyl penicillamine (SNAP) was previously reported to prevent cell cycle progression in many cell types: cerebellar glial cells (Garg et al. 1992), BALB/C 3T3 fibroblasts (Garg & Hassid 1990), endothelial cells (Sarkar et al. 1995), human airway smooth muscle cells (Hamad et al. 1999), lymphocytes(Kosonen et al. 1998), chick embryo retina glial cells (Magalhães et al. 2006), GH3 cells (Tian et al. 2010) and breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF7 (Laudański et al. 2001). By contrast, myoblasts were either stimulated or prevented in their proliferation, emphasizing the duality of NO towards cell proliferation (Ulibarri et al. 1999). Molecular studies on these effects have been focused on the G1-S phase transition because NO was more likely to arrest cells at the border of S phase, through the inhibition of the Cdk2/Cyclin A complex: Cdk2 expression was not altered while Cyclin A expression was repressed at the promotor level in vascular smooth cells (Guo et al. 1998; Sharma et al. 1999). Furthermore, Cdk2 itself was inhibited by the expression of the Cdk Inhibitor p21sdi1/Cip/Waf1(Tanner et al., 2000). Finally, in breast cancer cell lines MDA-MB-231, increasing NO levels by the use of NO donors blocks cell cycle in G1, through the inhibition of Cyclin D1 expression, and the maintenance of pRb hyperphosphorylation (Pervin et al. 2001). Therefore, strategies promoting either NO release or tempering and/or scavenging NO have become of special interest in cancer cell lines.

However, less interest has been put on the role of NO during cell division itself, at a non genomic level. Based upon previous results reporting that NO-donor SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine) promoted the transgression of the metaphase-anaphase block in amphibian eggs (Jeseta et al. 2012), we undertook to analyze its effects during meiosis. In amphibian oocytes, meiosis is a cell division process through which a diploid cell undergoes through two successive divisions without replication or depending upon transcription, to produce haploid cells, namely oocytes and polar bodies. Vertebrates oocytes are arrested in prophase of the first meiotic division (PI), resume meiosis in response to hormonal stimulation, in a process called maturation, and are stopped at metaphase of the second division, in anticipation to fertilization (J.-F. Bodart et al. 2002). Release from prophase I, which is analogous to a G2/M transition, is characterized by the organization of a microtubules array pushing the germinal vesicle towards the apex of the animal cortex. The breakdown of the nuclear envelope (GVBD, Germinal Vesicle Break Down) is followed by chromosomes condensation and organization of a bipolar spindle at the plasma membrane. Anchoring of this spindle at the cortex is accompanied by the appearance of a white spot at the apex of the oocyte. Then, a second meiotic division begins without replication, after the extrusion of the first polar body, but immediately stops at metaphase (Hausen & Riebesell 1991). These conditions enable to analyze the effect of compounds independently of their genotoxicity, since the onset of meiosis and the progression through the maturation process are independent of transcription (Bodart et al., 2002). Thus, such cellular context offer the opportunity to evaluate morphological alteration of spindle (Bodart et al. 2005), a structure crucial to genomic material segregation, that directly impacts on the molecular mechanisms driving meiosis. At the molecular level, MPF (Meiotic or M-Phase Promoting Factor), being an universal factor, promotes M-phase entry during mitosis or meiosis, and is made up of a catalytic subunit, Cdk1, and a regulatory sub-unit, Cyclin B (Norbury & Nurse 1990). The activity of this heterodimer is regulated by inhibitory phosphorylation on Thr14 and Tyr15, achieved by Wee1 and Myt1 kinases (Fattaey & Booher 1997) and by regulating the level of Cyclin B, which can be degraded through the ubiquitin pathway (Rolfe et al. 1997). MAPK xp42Mpk1 (Ferrell et al. 1991) is activated at the same time than MPF, and plays a crucial role in the establishment of the meiotic spindle (Bodart et al. 2005) and the inhibition of replication between the two meiosis divisions (Dupré et al. 2002).

Our aim was to assess the ability of NO-donor SNAP to prevent the activation of the molecular mechanisms triggering meiotic resumption, as well as to determine its potential effect on spindle morphogenesis. Here we showed that SNAP-induced effect on M-phase entry in amphibian oocytes are related to pH lowering whereas NO release appeared to alter meiotic spindle morphogenesis.

Materials and methods

REAGENTS AND TEST SUBSTANCES

All compounds were of molecular biology grade of purity. They were obtained from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France) except MS222 (Sandoz®) and collagenase (Roche Applied Science®). All tested solutions and media (ND96: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl2, 1 mM MgCl2, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) were freshly daily prepared or obtained extempore by appropriate dilutions of stock solutions in ND96 medium.

HANDLING OF FROGS AND OOCYTES

After anesthetizing *Xenopus* females (purchased from the University of Rennes I, France) by immersion in 1 g/L MS222 solution (tricaine methane sulfonate; Sandoz), ovarian lobes were surgically removed and placed in ND96 medium (in mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl2, 1 MgCl2, 5 Hepes–NaOH, pH 7.5). Fully grown stage VI oocytes were isolated and defolliculated by partial collagenase treatment for 30 min (1 mg/mL collagenase A, Roche Applied Science) followed by a manual microdissection. Oocytes were stored at 14°C in ND96 medium until experiments were performed. All animal experiments were performed at the animal facility of Lille University according to the rules of the European Community Council guidelines (86/609/EEC) for laboratory animal experimentation. The animal protocol was approved by the local institutional review board (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Nord-Pas-De-Calais, CEEA 07/2010).

TREATMENT AND ANALYSIS OF MEOTIC RESUMPTION

Meiotic resumption was induced by incubation of oocytes at 19°C in ND96 medium containing 10 μ M of progesterone (4 μ g/mL; Sigma–Aldrich). Maturation process (M-Phase entry) was scored by the appearance of a white spot at the animal pole of the oocyte.

Oocytes were incubated with S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) at different concentrations (0.5, 1, 2.5 and 5 mM; Enzo lab science), N-Acetyl-D,L-penicillamine disulfide (NAP; 1,25 mM; Santa Cruz biotechnology), NaOH (2 M) and/or HCl (6M). Oocytes are placed at 23 °C. An individual observation of oocytes was performed each hour during 10h under binocular microscope and the number of oocytes with a white spot was measured.

MICROINJECTION OF CYTOPLASM OF MATURE OOCYTES

Defolliculated oocytes were incubated overnight in the presence of progesterone $(4\mu g/mL)$ at 19°C. Oocyte with a white spot were selected and rinsed to remove all traces of progesterone. 40 nL of cytoplasm were taken directly into the oocyte, using a positive displacement digital micropipette (Nichiryo) and 10 nL were injected at the equator of immature oocytes.

Before the micro-injection, immature oocytes were placed during 1 hour in presence of SNAP (0.5, 1, 2.5 and 5 mM; Enzo lab science), NAP (1.25 mM ; Enzo lab science), NaOH (2 M) and/or HCl (6 M). Microinjected oocytes were placed at 23°C for maturation and the white spot appearance was reported every hour.

ELECTROPHORESIS AND WESTERN-BLOTTING

Eggs were lysed in homogenization buffer and centrifuged for 5 min at 10 000×g (4°C) to eliminate yolk platelets. Supernatants were added with one volume of Laemmli 2X buffer 4% beta-mercaptoethanol, heated at 100°C for 3 min and stored at -20°C until analysis. Proteins from oocytes were separated by SDS-PAGE (15–17%) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom). Blots were blocked with 10% low fat dry milk and incubated with specific antibody. p90^{Rsk} was detected using the polyclonal rabbit antibody (p90Rsk1 C-21 sc231, Santa Cruz Biotechnology), ERK2 was detected using mouse monoclonal antibody (Erk2 D-2 sc1647, Santa Cruz Biotechnology), anti-P-H3 antibodies (S10, Cell Signaling,) and P-Tyr15 Cdk1 using overnight incubation with mouse monoclonal antibody (tyr15, Cell signaling). Nitrocellulose membranes with bounded primary antibody were then incubated with appropriate secondary antibodies (Sigma Aldrich).

The signals were detected through chemiluminescent assay (Clarity[™] Western ECL Substrate, Biorad).

CYTOLOGICAL ANALYSIS

Oocytes were fixed in Smith reagent (Smith A: Potassium Bichromate 17 mM; Smith B: formol and acetic acid 80/20%) for a minimum period of 12 hours. They were dehydrated and embedded in paraffin. Section of 7 microns were cut and stained with the nuclear red (0,1 g of nuclear red QSP 100 mL aluminium sulfate 5%) to reveal nuclear structures and chromosomes, and with picro indigo carmine (0,25g of picro indigo carmine QSP 100 mL saturated picric acid) specific for cytoplasmic structures. This technique highlights the spindles and condensed chromosomes, even if they are ectopic or atypic (Flament et al., 1997, 1996).

STATISTICAL ANALYSIS

All results are shown as mean +/- standard error of the mean (SEM); N refers to the number of separate experiments performed (number of females) and n corresponds to the number of exposed oocytes. For statistical analysis and graphical presentation, Excel and Power Point (Microsoft Corporation) softwares were used. The significant differences were assessed with SigmaStat 3.1 software (SysStat, Erkrath, Germany) by means of one-way analyses of variance followed by *post-hoc* Tukey's tests. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

Results

1. NO-donor SNAP alters M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis induced by progesterone

PI oocytes can be characterized histologically by the presence of a germinal vesicle (VG). After addition of progesterone in the medium the oocyte undergo a meiosis progression and the germinal vesicle rise up to the animal pole setting aside the subcorticals pigments leading to the appearance of a white spot. This phenomenon is considered as the first part of the meiosis progression process called maturation. Maturation is referred as the set of physiological, biochemical and electrophysiological events leading from prophase I to metaphase II. A prophase I (PI) oocyte shows neither the same histological profile nor the same biochemical profile that an oocyte in metaphase II (MII).

During this process the germinal vesicle breaks, this phenomenon is called: germinal vesicle break down (GVBD). Low concentrations of SNAP (500 μ M and 1 mM) had no effect on the meiosis resumption process rate induced by progesterone in *Xenopus* oocyte. There was no delay in the white spot appearance between the lowest concentration of SNAP and the progesterone treated oocytes (**Figure 1.A**), 90%, 88.19% and 82.80% were obtained in progesterone alone or in association with 500 μ M and 1 mM of SNAP respectively (**Figure 1.B**). In contrast, at highest concentrations of SNAP (2.5 and 5 mM) oocyte M-phase entry was delayed. The percentage of oocytes displaying a white spot dropped to 32.12 % and 11.70% in the presence of 2.5 and 5 mM SNAP respectively (**Figure 1.B**).

As previously described, oocytes do not exhibit the same cytological profile according to their progression through maturation. After GVBD, the microtubule spindle is formed at the vicinity of the plasma membrane and the chromosomes are aligned into an equatorial plate. Oocyte showing only a spindle anchored to the membrane in cytological analysis are metaphase I (MI) oocytes. This first meiosis division leads to the appearance of a polar body. A second meiotic division begins. MII oocytes can be defined by the presence of the first polar body and the presence of a spindle anchored to the membrane. Cytological analysis of oocytes showed that the higher the concentration of SNAP was, the earlier the stage at which the oocytes were blocked. The control oocytes exposed or not with progesterone showed a majority of metaphase II and prophase I (PI) oocytes respectively. In presence of 500 μ M SNAP, 50% of oocytes were

in MII, 33% were blocked at metaphase I (MI) stage and 17% at GVBD, without exhibiting any typical organization. With 1 mM SNAP, 57% of oocytes were blocked in MI phase. With 2.5 mM SNAP, 43% of oocytes were blocked in MI phase while 41% of oocytes were blocked at GVBD stage (**Figure 1. C**).

Similarly, there was a correlation between the high concentrations and the number of atypical spindles observed. At 2.5 mM SNAP, more than half of the spindles were atypical failing to exhibit bipolarity and correct chromosomes equatorial alignment (**Table 1 and Figure 1.D**). By contrast, control oocytes treated with progesterone, showed normal symmetrical spindle formation, anchored to the plasma membrane and a chromosomes alignment on the metaphase plate.

In order to check if oocytes without white spot were still blocked in prophase I, the phosphorylation status of Erk and Rsk (MAPK cascade), Cdc2 (MPF) and Histone H3 (a target of active MPF) were analyzed by western blot on individual cells. Usually, prophase I oocytes showed the phosphorylation of Cdc2 on tyrosine 15 and the absence of phosphorylation on Histone H3, Erk and Rsk. By contrast, mature oocytes showed the phosphorylation of Histone H3, Erk and Rsk and a dephosphorylation of Cdc2 on tyrosine 15. Analysis of oocytes treated with SNAP do not reveal a homogenous profile in this population. Indeed, 67.6 % of oocytes exhibited a phosphorylation of Histone H3 with an active MAPK cascade (phosphorylated Erk and Rsk) but an inactive MPF (Cdc2 was phosphorylated on Tyr 15) (Figure 2, supplementary figure 1 and supplementary table 1 and 2). This heterogeneous response in biochemical profiles suggested the interaction of NO with different signaling pathways.

2. NO-donor SNAP disturbs M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis induced by mature oocyte cytoplasm injection.

Micro-injection of mature oocyte cytoplasm, containing active MPF, triggers Cdc25 activation in a prophase I oocytes (Masui and Markert, 1971; Rime et al., 1994). In turn Cdc25 activates the pre-MPF (inactive stock of MPF) by Cdc2 dephosphorylation and enables oocyte meiotic resumption in absence of any hormonal stimulation. This mechanism is called the MPF autoamplification loop. Low concentrations of SNAP (500 μ M and 1 mM) showed no significant effect on the meiotic resumption of *Xenopus* oocyte micro-injected with cytoplasm of mature oocytes. Indeed, 7 hours after the micro-injection, 83% of the control oocytes showed a white spot against 67% and 55% in the presence of 500 μ M and 1 mM of SNAP respectively (**Figure 3.A**). A highest concentration of SNAP (2,5mM) totally abolished appearance of white spot in micro injected oocytes, highlighting a potential sensitivity of the MPF auto-amplification loop toward NO (**Figure 3.A**).

Morphological analysis was completed by histological study. Control oocytes, micro-injected (micro-inj) or not (ND) were mainly blocked in PI and MII phases respectively. In the presence of SNAP at 500 μ M, oocytes stopped in MI and GVBD phases (43% and 39% respectively). Then, in presence of 1 mM or 2.5 mM of SNAP, 37% and 61% of the oocytes were respectively blocked at GVBD (**Figure 3.B**). As with progesterone stimulation, the spindle became atypical with the highest concentration of SNAP. At 2.5 mM SNAP all spindles observed were found to be atypical (**Table 2**).

Oocytes without external morphological sign of meiotic resumption, were individually analyzed at the biochemical level. Only 12% of oocytes (4/31) showed the classical profile for Cdc2 and histone H3 phosphorylations. We noticed a clear heterogeneity in the detected profiles (**Figure 2 and Supp. Table. 3 and 4**). Nevertheless, 68.1 % of oocytes exhibited the histone H3 phosphorylation, relevant for a MPF activation. Phosphorylation of Erk and Rsk (MAPK pathways) were extremely heterogeneous and no clear trend was observed (data not shown).

Taken together, these results suggest that signaling pathways (progesterone pathway or MPF auto-amplification loop) are well activated but the NO-donor disturbs the morphological events associated to meiosis resumption (white spot appearance and spindle assembly).

3. Acid pH promoted by SNAP specifically inhibits the white spot appearance

SNAP is a NO-donor but also acidify the culture medium. The next set of experiments precise the respective role of the SNAP induced NO released and/or pH decreased on M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis. The highest concentration of SNAP induced a pH decrease around 4 (data not shown). In a previous studies, intracellular acidification was shown to delay hormonal-induced meiotic resumption and alters spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes (Sellier et al., 2006). In the control conditions of experiment, 24 hours after the addition of progesterone, 89.19% of the oocytes showed a maturation spot against only 1.11% in the presence of HCl. When the pH is buffered with NaOH, 79.89% of oocytes exhibited a white

spot. In the 2.5 mM SNAP solution, pH was buffered at pH 7.4 with NaOH before the introduction of oocytes in medium in order to evaluate the effect of an acidification. The percentage of oocytes with a white spot, which dropped to 0% in the presence of 2.5 mM SNAP, was also restored up to 87.78% in buffered solution (**Figure 4.A**). Moreover, in these last conditions, more than half of the spindles were atypical and not located at the plasma membrane.

In an other hand, when maturation is induced by cytoplasm micro-injection, we observed that the medium with HCl significantly impaired meiotic resumption and the NaOH buffering medium restored percentage of oocytes with white spot (**Figure 4.B**). Strikingly, the effects of 2.5 mM SNAP were reversed by buffering pH: 75.67% of white spot were detected. Nevertheless, 93.33% of these oocytes exhibited ectopic and atypical spindles.

Taken together, these results showed that acid pH promoted by SNAP specifically inhibits the white spot appearance. Even if pH is restored in SNAP medium, the spindles observed were atypical suggesting the effect of SNAP on the spindle assembly is independent of any pH variation and only dependent on the NO release.

4. Atypical spindle assembly is NO release dependant

To address this point, we have used N-Acetyl-D,L-penicillamine disulfide (NAP) in the last experiment. NAP is a degradation product of S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP). Basically, NAP has the same molecular characteristics as SNAP without releasing NO. It is used in several publications as a control for studying SNAP toxicity (Bourdon et al., 2003; Babich et al., 1999; Chen et al., 2005b).

Oocytes treated with progesterone showed typical characteristic of a MII oocytes with no spindle assembly problem (**Figure 5.A**). The oocytes exposed to SNAP showed atypical spindles with no aligned chromosomes (70%) that were maintained even in restored pH medium with NaOH (81.25%, **Figure 5.B/C**).

By contrast, when SNAP was replaced by the NAP and the pH was NaOH buffered, only8.88% of the total spindles remains atypical. This result suggests that without NO release there is no effect of SNAP on spindle organization (**Figure 5.D**). Therefore, spindle assembly appeared to be NO-dependent.

Discussion

Gasotransmitters like NO have been involved in many physiological processes. Among this variety of functions, there is in an increasing literature in the field of reproductive biology and in the pathological context of cancer, both relying on the effects of NO during cell cycle progression, using cellular models such as cancer cells lines and physiologically-synchronized populations of gametes (Sengoku et al., 2001; Chmelíková et al., 2010; Jeseta et al., 2012; Ying and Hofseth, 2007; Choudhari et al., 2013; Garg et al., 1992; Garg and Hassid, 1990; Sarkar et al., 1995; Hamad et al., 1999; Kosonen et al., 1998; Magalhães et al., 2006; Tian et al., 2010; Laudański et al., 2001; Ulibarri et al., 1999; Guo et al., 1998; Sharma et al., 1999; Tanner et al., 2000; Pervin et al., 2001). Studied carried out in cancer cell lines focused on the effects at the transcription level, which revealed inhibition of Cdk-Cyclin complexes responsible for the G1/S transition, either through the down-regulation of Cyclin levels expression or up-regulation of Cdk inhibitor expression (Guo et al., 1998; Sharma et al., 1999; Ishida et al., 1997; Tanner et al., 2000; Pervin et al., 2001). Here we have chosen to address the role of NO during the early steps of cell division during meiosis, taking advantage of the Xenopus oocytes release from prophase being considered as analogous to G2/M (or M-Phase entry), in a non genomic context (Bodart et al., 2002a). Either triggered by hormonal stimulation (progesterone) or by mature oocyte cytoplasm injection, M-phase entry was delayed by NO-donor SNAP: occurrence of white spot was delayed and spindle organization was disturbed.

Since decomposition of SNAP, and NO release, was accompanied by a pH decrease, we undertook the discrimination between the effects relative to pH in comparison of those of NO itself. In *Xenopus* oocytes, the resumption of meiosis is accompanied by a transient alkalization (Lee and Steinhardt, 1981), which, when buffered by MOPS pH 6.9, hinders the migration of germinal vesicle towards the animal pole and promotes ectopic spindle formation in 30% (Flament et al., 1996). Similarly, acidification induced by procaine alters spindle positioning, which remains in deep cytoplasm (Flament et al., 1997). From the latter studies, it appeared that microtubules apparatus involved in germinal vesicle migration was affected by pH decrease, but that the spindle morphology *per se* was not affected. Furthermore, we previously reported that decreasing pH with NH₄Cl delayed progesterone-induced GVBD in a dose-dependent manner. In our conditions, pH buffering in SNAP solutions prevented SNAP-induced inhibition of M-phase entry but not meiotic spindle morphogenesis alteration, regardless to the type of M-

phase entry stimulation. Therefore, effects on meiosis kinetics were more likely to be attributed to pH changes than to NO release.

We observed also a differential sensitivity towards SNAP between progesterone and MIinduced mechanisms of meiotic resumption or M-phase entry. The two mechanisms are quite different since progesterone request protein synthesis and activation of both MPF and MAPK pathways for meiosis completion until metaphase II, while injection of active MPF within the mature oocyte cytoplasm triggers MPF auto-activation loop, which includes Cdc25. In order to investigate the difference of sensitivity, western blots were performed with individual oocytes treated with 2.5 mM SNAP followed by mature oocyte cytoplasm injection. Taken together, our observations made at the molecular level suggested that the majority of oocytes exhibited a biochemical activation profile, as in negative control oocytes that remained in prophase. The predominant presence of a phosphorylated form of MPF, seemed in line with the inhibition of the MPF auto-amplification loop. Proteins S-Nitrosylation formally occurs through an oxydative reaction of NO and Cys thiol, and have been involved in several pathologies(Foster et al., 2009b). In the case of the molecular network herein described as responsible for M-phase entry, Cdc25 isoforms were identified in other studies as Cys-dependent phosphatases, exhibiting a Cys-containing catalytic loop that is recognized for S-Nitrosylation target (Foster et al., 2009a). Different studies showed that nitrosative stress, that is to say increase in NO, resulted in Cdc25 inhibition (Majumdar et al., 2012; Tomko and Lazo, 2008). Since we demonstrated previously that the auto-amplification loop of MPF was not affected by pH changes (Sellier et al., 2006), our main hypothesis regarding the higher sensitivity towards SNAP of M-phase entry induced by injection of mature oocyte cytoplasm, is that Cdc25 activity is impaired by S-Nitrosylation.

Once determined that delay and inhibition of M-phase entry were attributed to pH-related effects of NO-donor SNAP, we attempted to determine if alteration of spindle morphology could be related to NO effects. Two different strategies were undertaken. Firstly, we used NO-chelator CPTIO but the latter failed to hinder the alteration of the spindle induced by SNAP (data not shown). Because NO-chelation failure cannot be discarded, even in microdomains essentials to division process, we secondly opted for the use of NAP, which appears as the most reliable negative control. When oocytes were stimulated for M-phase entry in presence of pH 7.4 buffered solution of NAP, no alteration of spindle morphogenesis was recording, suggesting that NO released by SNAP was responsible for the failure of bipolarity establishment and

chromosomes misalignment. Because of the heterogeneity of treated oocytes with SNAP for MPF and MAPK pathways, no correlation could be established between these proteins and spindle phenotype. Nevertheless, it was reported that NO, inhibits mitosis through Tyrosine residue nitrosylation in plant models, and alters cross walls orientation, presumably by impairing microtubules organization (Jovanović et al., 2010; Blume et al., 2013).

Our study seems to show that nitric oxide would cause a bad implementation of the spindle. It would therefore seem interesting to study the effect of NO on proteins involved in the formation of the spindle and more particularly the possibility of S-nytrosilation of this proteins. It is important to notice that these atypical spindles mostly present the same formation defect: nonaligned chromosomes, defect in the microtubules assembly and most of this spindle are ectopic. Together, these observations suggest that the NO would more specifically affect cytoskeletal proteins. Some studies, in animals and plants, have already showed that S-nytrosilation can touch some of these proteins like: the Microtubule-associated protein 4 (Greco et al., 2006), Tubulin α 6 chain, Tubulin α 4 chain and Actin 2/7 (Lindermayr et al., 2005).

We have shown that a high concentration of NO results in the *Xenopus* oocyte premature maturation arrest and poor implementation of the spindle. This observation are consistent with all the papers demonstrating the need of a decrease in the concentration of NO in the oocytes for the meiosis resumption (Nakamura et al., 2002).

Figures and Legends



Figure 1: NO donor SNAP alters M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis induced by progesterone. (A) Oocytes were incubated (or not) in SNAP at different concentrations and progesterone. Some oocytes were maintained in culture medium without treatment (ND) and some oocytes in progesterone alone (PG). Oocytes with a white spots were recorded every hour for 10h and at 24h (B) Percentage of white spot observed at 24h after addition of progesterone and SNAP at different concentrations (C) Percentage of oocytes found in different phases of meiosis: Prophase I (PI), Germinal Vesicle Break Down (GVBD), Metaphase I (MI) and Metaphase II (MII). The oocytes were treated with progesterone alone or in association with SNAP at different concentrations. Oocytes were fixed in smith reagent, cut with microtome and stained with nuclear red and picro indigo carmin method. The experiment was performed three times on three different females. (D) Photo of spindle in oocyte treated with 2.5 mM SNAP. Arrow shows the chromosomes. a. The photo shows an atypical spindle with unaligned chromosomes. Bar = 20 μ m. N= 7 ; n =20. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.



Figure 2: Biochemical analysis of MPF activation in presence of SNAP 2,5 mM. This graphic represent the Cdc2 tyr15 and Histone H3 phosphorylation patterns in oocytes. Immature oocytes are oocyte non treated and, which presents no white spot, Mature oocytes were treated with progesterone only (or micro-injected with cytoplasm of mature oocyte) and they present a white spot. SNAP 2,5 mM + PG and SNAP 2,5 mM + MI are oocyte treated with SNAP 2,5 mM during 15 minutes and exposed to progesterone or injected with cytoplasm of mature oocyte respectively. All the oocytes studied in these conditions showed no white spot. Classic western blot activity is showed on the top of each situation.



Figure 3: NO donor SNAP disturbs M-phase entry and meiotic spindle morphogenesis induced by mature oocyte cytoplasm injection. (A) Oocytes were incubated (or not) in SNAP at different concentrations during 15 minutes and micro-injected with cytoplasm of mature oocyte. Oocytes with a white spots were recorded after 7 hour. Some oocytes were maintained in culture medium without treatment (ND) and some oocytes are micro-injected with cytoplasm of mature oocyte alone (micro-inj). All experiments were performed three times, using oocytes from three different females (15 oocytes per condition). (B) Percentage of oocytes found in different phases of meiosis: Prophase I (PI), Germinal Vesicle Break Down (GVBD), Metaphase I (MI) and Metaphase II (MII). The oocytes micro-injected with cytoplasm of mature oocyte alone or micro-injected in the presence of SNAP at different concentrations. N=3, n=15. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.



Figure 4: Acid pH promoted by SNAP inhibits the white spot appearance. Oocytes were incubated (or not) in SNAP at different concentrations, HCl and/or NaOH during 15 minutes. Then oocytes were treated with progesterone (A) or injected with cytoplasm of mature oocytes (B). Oocytes with a white spots were recorded after 7 hour. N=5, n=15. Statistical significance was accepted for *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.



Figure 5: Atypical spindle assembly is NO released dependant. Photo of representative spindles observed in the different experimental conditions. Red arrows show the chromosomes. The total number of atypical spindles is indicated for each condition. (A) Mature oocyte, treated with progesterone (PG), showing spindle membrane anchored with aligned chromosomes and the first polar body (PB). (B) Oocytes exposed to SNAP 2,5 mM and progesterone, showing atypical spindle with unaligned chromosomes. (C) Oocytes exposed to SNAP 2,5 mM and progesterone in buffered pH with NaOH. These oocytes show atypical spindle with unaligned chromosomes. (D) Oocytes exposed to NAP 2,5 mM and progesterone, in buffered pH with NaOH. This oocytes show spindle membrane anchored with aligned chromosomes and the first polar body. Bar = 20μ m. All experiments were performed three times, using oocytes from three different females.

	Spindle	Atypical Spindle	Total
ND	0	0	15
PG	12	0	15
SNAP 500 μM + PG	11	0	15
SNAP 1 mM + PG	19	4 (21,1%)	25
SNAP 2,5 mM + PG	14	8 (57,14%)	26

Table 1: SNAP increase the atypical spindle percentage in a dose dependant manner. This table shows the number of oocytes with a spindle and the number of oocytes with an atypical spindle. Oocytes were incubated with progesterone alone or with SNAP at different concentrations.

	Spindle	Atypical Spindle (%)	Total
Micro-inj	17	0	17
ND	0	0	18
SNAP 500 μM + Micro-inj	9	2 (22,22%)	18
SNAP 1 mM + Micro-inj	6	4 (66,67%)	21
SNAP 2,5 mM + Micro-inj	4	4 (100%)	16

Table 2: SNAP leads to an increase of the atypical spindle in a dose dependant manner. This table shows the number of oocytes with a spindle and the number of oocytes with an atypical spindle. Oocytes were micro-injected with cytoplasm of mature oocytes alone (micro-inj) or in the presence of SNAP at different concentrations.

References

Babich, H., H.L. Zuckerbraun, S.T. Hirsch, and L. Blau. 1999. In vitro Cytotoxicity of the Nitric Oxide Donor, S -Nitroso- N -acetyl-peraciUamine, towards Cells from Human Oral Tissue. Pharmacol. Toxicol. 84:218–225.

Biswas, S., S.N. Kabir, and A.K. Pal. 1998. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. J. Reprod. Fertil. 114:157–61.

Blume, Y.B., Y.A. Krasylenko, O.M. Demchuk, and A.I. Yemets. 2013. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. Front. Plant Sci. 4:530.

Bodart, J.-F., S. Flament, and J.-P. Vilain. 2002. Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. Mol. Reprod. Dev. 61:570–4.

Bodart, J.-F.L., F.Y. Baert, C. Sellier, N.S. Duesbery, S. Flament, and J.-P. Vilain. 2005. Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. Dev. Biol. 283:373–83.

Bourdon, E., D.-K. Kang, M.C. Ghosh, S.K. Drake, J. Wey, R.L. Levine, and T.A. Rouault. 2003. The role of endogenous heme synthesis and degradation domain cysteines in cellular iron-dependent degradation of IRP2. Blood Cells, Mol. Dis. 31:247–255.

Chen, T., L.L. Pearce, J. Peterson, D. Stoyanovsky, and T.R. Billiar. 2005. Glutathione depletion renders rat hepatocytes sensitive to nitric oxide donor-mediated toxicity. Hepatology. 42:598–607.

Chmelíková, E., M. Jeseta, M. Sedmíková, J. Petr, L. Tůmová, T. Kott, P. Lipovová, and F. Jílek. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. Zygote. 18:235–44.

Choudhari, S.K., M. Chaudhary, S. Bagde, A.R. Gadbail, and V. Joshi. 2013. Nitric oxide and cancer: a review. World J. Surg. Oncol. 11:118.

Dupré, A., C. Jessus, R. Ozon, and O. Haccard. 2002. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. EMBO J. 21:4026–36.

Fattaey, A., and R.N. Booher. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. Prog. Cell Cycle Res. 3:233–40.

Ferrell, J.E., M. Wu, J.C. Gerhart, and G.S. Martin. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs. Mol. Cell. Biol. 11:1965–71.

Flament, S., J.F. Bodart, E. Browaeys, M. Bertout, A. Rousseau, J. Gannon, and J.P. Vilain. 1997. Procaine-induced maturation of Xenopus oocytes is mediated by a transient activation of M-phase promoting factor. Zygote. 5:11–9.

Flament, S., E. Browaeys, J.L. Rodeau, M. Bertout, and J.P. Vilain. 1996. Xenopus oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. Int. J. Dev. Biol. 40:471–6.

Foster, M.W., M.T. Forrester, and J.S. Stamler. 2009a. A protein microarray-based analysis of S-Nitrosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:18948–53.

Foster, M.W., D.T. Hess, and J.S. Stamler. 2009b. Protein S-Nitrosylation in health and disease: a current perspective. Trends Mol. Med. 15:391–404.

Garg, U.C., L. Devi, H. Turndorf, L.R. Goldfrank, and M. Bansinath. 1992. Effect of nitric oxide on mitogenesis and proliferation of cerebellar glial cells. Brain Res. 592:208–12.

Garg, U.C., and A. Hassid. 1990. Nitric oxide-generating vasodilators inhibit mitogenesis and proliferation of BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171:474–9.

Greco, T.M., R. Hodara, I. Parastatidis, H.F.G. Heijnen, M.K. Dennehy, D.C. Liebler, and H. Ischiropoulos. 2006. Identification of S-Nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:7420–5.

Gross, S.S., and M.S. Wolin. 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. Annu. Rev. Physiol. 57:737–69.

Guo, K., V. Andrés, and K. Walsh. 1998. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. Circulation. 97:2066–72.

Hamad, A.M., S.R. Johnson, and A.J. Knox. 1999. Antiproliferative effects of NO and ANP in cultured human airway smooth muscle. Am. J. Physiol. 277:L910–8.

Hausen, P., and M. Riebesell. 1991. The early development of Xenopus laevis: an atlas of the histology. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 142 pp.

Hess, D.T., and J.S. Stamler. 2012. Regulation by S-Nitrosylation of protein post-translational modification. J. Biol. Chem. 287:4411–8.

Jeseta, M., M. Marin, H. Tichovska, P. Melicharova, K. Cailliau-Maggio, A. Martoriati, A. Lescuyer-Rousseau, R. Beaujois, J. Petr, M. Sedmikova, and J.-F. Bodart. 2012. Nitric oxide-donor SNAP induces Xenopus eggs activation. PLoS One. 7:e41509.

Jovanović, A.M., S. Durst, and P. Nick. 2010. Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. J. Exp. Bot. 61:901–9.

Kosonen, O., H. Kankaanranta, M. Lähde, P. Vuorinen, P. Ylitalo, and E. Moilanen. 1998. Nitric oxidereleasing oxatriazole derivatives inhibit human lymphocyte proliferation by a cyclic GMP-independent mechanism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:215–20.

Kröncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen. 1995. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 376:327–43.

Laudański, P., J. Dziecioł, T. Anchim, and S. Wołczyński. 2001. The influence of glyco-nitric oxide conjugate on proliferation of breast cancer cells in vitro. Folia Histochem. Cytobiol. 39 Suppl 2:87–8.

Lee, S.C., and R.A. Steinhardt. 1981. pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of Xenopus laevis. Dev. Biol. 85:358–69.

Lindermayr, C., G. Saalbach, and J. Durner. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. Plant Physiol. 137:921–30.

Magalhães, C.R., R.E.S. Socodato, and R. Paes-de-Carvalho. 2006. Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. Int. J. Dev. Neurosci. 24:53–60.

Majumdar, U., P. Biswas, T. Subhra Sarkar, D. Maiti, and S. Ghosh. 2012. Regulation of cell cycle and stress responses under nitrosative stress in Schizosaccharomyces pombe. Free Radic. Biol. Med. 52:2186–200.

Masui, Y., and C.L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177:129–45.

Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43:109–42.

Nakamura, Y. Nakamura, Y. Yamagata, N. Sugino, H. Takayama, and H. Kato. 2002. Nitric Oxide Inhibits Oocyte Meiotic Maturation. Biol. Reprod. 67:1588–1592.

Napoli, C., and L.J. Ignarro. 2009. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. Arch. Pharm. Res. 32:1103–8.

Norbury, C., and P. Nurse. 1990. Controls of cell proliferation in yeast and animals. Ciba Found. Symp. 150:168–77; discussion 177–83.

Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327:524–6.

Pervin, S., R. Singh, and G. Chaudhuri. 2001. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:3583–8.

Rime, H., D. Huchon, V. De Smedt, C. Thibier, K. Galaktionov, C. Jessus, and R. Ozon. 1994. Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into Xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. Biol. Cell. 82:11–22.

Rolfe, M., M.I. Chiu, and M. Pagano. 1997. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. J. Mol. Med. (Berl). 75:5–17.

Sarkar, R., R.C. Webb, and J.C. Stanley. 1995. Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. Surgery. 118:274–9.

Schorderet-Slatkine, S., and K.C. Drury. 1973. Progesterone induced maturation in oocytes of Xenopus laevis. Appearance of a "maturation promoting factor" in enucleated oocytes. Cell Differ. 2:247–54.

Sellier, C., J.-F. Bodart, S. Flament, F. Baert, J. Gannon, and J.-P. Vilain. 2006. Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated MAPK in Xenopus oocytes. J. Cell. Biochem. 98:287–300.

Sengoku, K., N. Takuma, M. Horikawa, K. Tsuchiya, H. Komori, D. Sharifa, K. Tamate, and M. Ishikawa. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. Mol. Reprod. Dev. 58:262–8.

Sharma, R. V, E. Tan, S. Fang, M. V Gurjar, and R.C. Bhalla. 1999. NOS gene transfer inhibits expression of cell cycle regulatory molecules in vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 276:H1450–9.

Tanner, F.C., P. Meier, H. Greutert, C. Champion, E.G. Nabel, and T.F. Luscher. 2000. Nitric Oxide Modulates Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins : A Cytostatic Strategy for Inhibition of Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. Circulation. 101:1982–1989.

Tian, C., F. Ye, L. Wang, Y. Deng, Y. Dong, X. Wang, T. Xu, T. Lei, and X. Wang. 2010. Nitric oxide inhibits ghrelin-induced cell proliferation and ERK1/2 activation in GH3 cells. Endocrine. 38:412–6.

Tomko, R.J., and J.S. Lazo. 2008. Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress. Cancer Res. 68:7457–65.

Ulibarri, J.A., P.E. Mozdziak, E. Schultz, C. Cook, and T.M. Best. 1999. Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpencillamine, stimulate myoblast proliferation in vitro. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 35:215–8.

Ying, L., and L.J. Hofseth. 2007. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. Cancer Res. 67:1407–10.

Zini, A., M.K. O'Bryan, M.S. Magid, and P.N. Schlegel. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. Biol. Reprod. 55:935–41.

Effets du NO sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

1. CPTIO : un contrôle négatif efficace ?

Afin de vérifier si la formation de fuseaux atypiques était due à la formation de NO engendrée par le SNAP (article 1) nous avons, dans un premier temps, utilisé le 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (CPTIO), un chélateur de NO. Le CPTIO est utilisé depuis plusieurs années comme chélateur de NO dans les modèles animaux *in vitro* de par sa spécificité pour le NO comparé à d'autre chélateur comme le dithiocarbamates de fer ou l'oxyhémoglobine (Hogg, 2010).



Figure 48 : Effet du CPTIO sur les effets du SNAP sur la reprise de méiose. (A) Les ovocytes ont été incubés (ou non) en présence de SNAP à différentes concentrations, de CPTIO, de NaOH et/ou HCl et la maturation a été induite par la progestérone. Le pourcentage de tache blanche a été relevé 24h après l'addition de la progestérone. La présence d'étoiles marque une différence significative avec le contrôle progestérone. La présence de hashtag marque la différence significative avec le contrôle progestérone + CPTIO. N = 6 n = 15. (B) Pourcentage des ovocytes trouvés dans les différentes phases de la méiose : Prophase I (PI), Germinal vésicules Break Down (GVBD), Métaphase I (MI), Transitoire Microtubule Array (TMA), Anaphase I et Metaphase II (MII). Les ovocytes ont été traités avec de la progestérone avec ou sans SNAP à des concentrations différentes, de CPTIO et / ou NaOH. N = 3, n = 10.

Cependant, en présence de ce composé ni l'apparition des taches de maturation, ni la formation normale des fuseaux ne sont restaurées. Le pourcentage d'ovocytes avec une tache de maturation tombe respectivement à 8,89% de SNAP 2,5 complémenté de CPTIO (Figure 48.A). En présence de SNAP 2,5 mM et de CPTIO, tous les ovocytes sont bloqués en Prophase I et

montrent une VG (Figure 48.B). Dans cette condition, les ovocytes sont soumis uniquement à l'effet « acide » du milieu. Plus le milieu est acide, plus fort est l'effet inhibiteur sur la GVBD. Cela pourrait expliquer l'absence de reprise de méiose de ces ovocytes. Le CPTIO n'a aucun effet délétère sur la reprise de méiose lorsqu'il est utilisé seul, il ne peut donc pas être responsable de cette inhibition de la reprise de méiose. Lorsque les ovocytes sont maturés en présence de CPTIO, le pourcentage final d'ovocytes présentant une tache de maturation est de 80,63% contre 86,19% en présence de progestérone seule. Les ovocytes de la condition CPTIO présentent des fuseaux dont la morphogenèse ne semble pas perturbée. Lorsque les ovocytes sont maturés en présence de SNAP 2,5 mM complété de CPTIO et de NaOH le nombre d'ovocytes présentant une tâche de maturation remonte à 80% semblant indiquer que les ovocytes ont bien effectué leur reprise de méiose. Cependant la majorité de ces ovocytes sont bloqués en GVBD et en MI lorsqu'ils sont étudiés du point de vue cytologique (Figure 48.À et B).

La question de l'efficacité du CPTIO s'est alors posée. Bien que celui-ci change de couleur lorsqu'il réagit avec le NO, cette indication de couleur ne permet pas de savoir si l'ensemble du NO produit a été chélaté. Il n'est pas impossible de supposer que la concentration de CPTIO (10mM), qui a été utilisée dans nos expériences, ne soit pas suffisante pour chélater l'ensemble du NO libéré par une forte concentration de SNAP.
Étude des effets de l'hydrogène sulfuré sur la maturation et l'activation de l'ovocyte de porc ainsi que sur le développement précoce des embryons

Article 3: Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes

Nevoral J¹, Petr J², **Gelaude A**³, Bodart JF³, Kucerova-Chrpova V¹, Sedmikova M¹, Krejcova T¹, Kolbabova T¹, Dvorakova M¹, Vyskocilova A¹, Weingartova I¹, Krivohlavkova L¹, Zalmanova T¹, Jilek F¹.

(PLoS One. 2014)

Article 4: Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte

maturation in vitro

Nevoral J¹, Žalmanová T¹, Zámostná K¹, Kott T², Kučerová-Chrpová V¹, Bodart JF³, **Gelaude A**³, Procházka R⁴, Orsák M⁵, Klein P⁶, Dvořáková M¹, Weingartová I¹, Víghová A¹, Krejčová T¹, Hošková K¹, Němeček D¹, Pacholíková L¹, Chmelíková E¹, Jílek F¹, Petr J² (Article en préparation)

¹Research Institute of Animal Production, Pratelstvi 815, 10400 Prague 10-Uhrineves, Czech Republic

²Czech University of Life Sciences in Prague, Department of Veterinary Sciences, Kamycka 129, 16521 Prague 6-Suchdol, Czech Republic

³Université Lille1, Sciences et Technologies, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division – EA 4479, IFR 147, F-59655 Villeneuved Ascq Cedex, France

⁴Institute of Animal Physiology and Genetics, 27721, Libechov, Czech Republic

⁵Czech University of Life Sciences in Prague, Department of Chemistry, Kamycka 129, 16521 Prague 6-Suchdol, Czech Republic

⁶Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Pilsen, Biomedical Centre, alej Svobody 1655, 32300, Pilsen, Czech Republic

Les articles 3 & 4 s'inscrivent dans le cadre d'une collaboration de notre équipe avec le département des sciences vétérinaires, de l'université des Sciences de la Vie de Prague, en République Tchèque. Cette collaboration concerne l'étude des effets de l'hydrogène sulfuré sur la maturation et l'activation de l'ovocyte ainsi que sur le développement précoce des embryons. Si ces travaux peuvent apparaître annexes au travail de thèse, ils offrent un pendant aux travaux réalisés chez le Xénope. Notre équipe s'est inscrite dans cette collaboration à plusieurs niveaux : mise en œuvre et discussion des stratégies expérimentales, discussion des résultats et échange d'étudiants.

1. Contexte

La maturation, processus par lequel l'ovocyte reprend sa méiose depuis la prophase I jusqu'à un nouvel arrêt en métaphase II, est un processus indispensable à la préparation de l'ovocyte à la fécondation. Chez les grands mammifères, il est important que cette phase de maturation soit maitrisée afin de préparer, *in vitro*, des ovocytes à la fécondation dans le cadre de biotechnologies reproductives. La régulation de la maturation des ovocytes de mammifères et l'expansion de cumulus *in vivo* ne sont pas encore totalement comprises. Ces connaissances incomplètes peuvent compromettre la réussite et les rendements de la culture *in vitro* et mener à la perte de nombreux ovocytes destinés à la fécondation.

Il parait donc important de comprendre les mécanismes impliqués de ces phénomènes, mais aussi de définir les meilleures conditions de culture possible. Puisque le H₂S est également produit au niveau des organes reproducteurs mâles comme femelles (Liang et al., 2006, 2007; Kimura, 2011) et que d'autres gazotransmetteurs ont démontré des effets sur l'activation des ovocytes de porc (Petr et al., 2005), il semblait pertinent d'étudier et de comprendre son implication éventuelle dans la maturation.

2. Objectifs

L'objectif de cette étude était d'étudier l'implication de l'hydrogène sulfuré sur la maturation des ovocytes de porc. De manière originale dans le modèle porcin, ce travail visait à discriminer les effets du gazotransmetteur en fonction de la population cellulaire considérée (ovocytes versus cellules folliculaires).

3. L'expansion du cumulus d'ovocyte de porc

Les arrêts physiologiques et les caractéristiques morphologiques sont grossièrement similaires dans les ovocytes de xénope et de porc. Les deux modèles appartiennent au sousembranchement des vertébrés et les étapes de leur méiose sont quasi identiques. Les principales étapes sont représentées dans la figure 49. Quelques différences sont tout de même présentes, principalement au niveau morphologique : la taille de l'ovocyte, la répartition et la quantité du vitellus, etc... varient (Ješeta and Bodart, 2011). Parmi les différences existantes entre l'ovocyte de porc et l'ovocyte de xénope, l'une des principales concerne le phénomène d'expansion du cumulus. La reprise de méiose a lieu dans les follicules pré-ovulatoires dominants, en réponse de l'interaction entre les ovocytes et les cellules de la granulosa et du cumulus qui l'entoure. L'augmentation pré-ovulatoire d'hormone lutéinisante (LH) induit la production d'un signal dans les cellules somatiques folliculaires, qui résulte en la perte d'une activité inhibitrice et permet la maturation de l'ovocyte. La LH pourrait intervenir de manière directe sur les cellules du cumulus (Mattioli et al., 1998) ou de façon indirecte par la production de médiateurs spécifiques dans les cellules de la granulosa (Park et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005).



Figure 49 : Photographie des différents stades de la maturation ovocytaires de l'ovocyte de porc. (A) Vésicule Germinative (VG) Nucléolaire (B) VG condensée (C) VG condensée compacte (D) Chromosomes condensés (E) Métaphase I (F) Anaphase I (G) Télophase I (H) Métaphase II

Le nombre de jonctions GAP entre les cellules du cumulus change alors et se réduit (Larsen et al., 1986; Isobe et al., 1998). Le cytosquelette du cumulus subit un réarrangement (Sutovský et al., 1994, 1995; Procházka et al., 2000) et synthétise une matrice extracellulaire enrichie en acide hyaluronique (HA). Cette matrice déposée dans les espaces extracellulaires permet alors un processus d'expansion (Eppig, 1979).

La production de HA est contrôlée par la hyaluronan-synthase 2 (HAS2), qui est fortement exprimée dans les cellules du cumulus peu de temps après l'augmentation de LH. La maturation méiotique et l'expansion du cumulus sont simultanément régies par un réseau complexe de plusieurs voies de signalisation parmi lesquelles cAMP-PKA, Plk1-Cdc25-Cdc2, PI3K-Akt et

Mos-MEK-MAPK (Anger et al., 2004; A. Bagg et al., 2009; Fan et al., 2002; Kalous et al., 2009).

Une autre différence résulte de l'absence de OMI (Oocyte Maturation Inhibitor) dans les ovocytes de xénope. OMI est un facteur inhibiteur de la reprise de méiose produit par les cellules folliculaires, facteur responsable du maintien des ovocytes non dominants en prophase (Tsafriri et al., 1976; Stone et al., 1978; Hillensjö et al., 1978). Ainsi lorsque l'on dénude un ovocyte de porc cette inhibition est perdue. Ce phénomène est absent de l'ovocyte de xénope où la reprise méiotique n'est due qu'à un déclencheur hormonal.

4. Métabolisme de H₂S dans l'ovocyte de porc (article 4)

La présence des ARNm des enzymes du métabolisme du H₂S dans des ovocytes de porc à différents stades a été démontrée à l'aide de RT-PCR. La présence des ARNm de ces enzymes a été recherchée dans des ovocytes immatures en cours de croissance, compétents pour la maturation (stade VG, au terme de l'ovogenèse), ainsi que dans des ovocytes se trouvant en métaphase de méiose I (MI) ou II (MII).Les protéines CBS et CSE est présentes de façon constante et MPST n'est présente que dans les stades les plus précoces de la croissance puis voit sa quantité décroitre. L'ensemble de ces observations est résumé dans la figure 50. Au sein du cumulus, les trois enzymes n'apparaissent que dans les stades les plus avancés de la croissance jusqu'à la fin de maturation.



Figure 50 : Schéma représentatif des quantités relatives des ARNms des enzymes du métabolisme du H₂S au cours de la méiose.

La présence des protéines CBS, CSE et MPST à ces différents stades a ensuite été évaluée par immuno-empreinte. Les quantités de CBS et CSE varient au cours de la méiose avec une diminution significative dans les ovocytes en MI, tandis que MPST diminue après la reprise de méiose et n'est plus synthétisée.

- 5. Le H₂S présente un effet antagoniste sur la reprise de méiose et l'expansion du cumulus de porc (article 3 et 4)
 - 5.1. Le Na₂S, un donneur de H₂S, entraine une accélération de la reprise de méiose des ovocytes de porc (article 3)

La maturation ovocytaire a été étudiée après coloration à l'orcéine (mise en évidence des fibres élastiques matures). Cette coloration permet de définir le stade de la méiose dans lequel se trouve un ovocyte.

L'exposition des ovocytes de porc au Na₂S entraine une augmentation du nombre d'ovocytes en métaphase II de façon dépendante de la dose. Le nombre d'ovocytes présentant une GVBD ou ayant effectués une maturation complète augmente de façon significative en présence de Na₂S à une concentration minimum de 150 μ M. A des concentrations plus fortes, de l'ordre de 300 μ M, le Na₂S accélère aussi bien l'apparition de la GVBD que la transition MI vers MII. En effet, le nombre d'ovocytes ayant effectué la GVBD augmente de façon significative après 14-20h de culture, alors que celui ayant effectué la transition MI vers MII augmente significativement après 25h de culture.

5.2. Le Na₂S induit une diminution de l'expansion du cumulus et de la quantité de HA produite (article 3)

L'expansion du cumulus, accompagnée par la formation d'acide hyaluronique, est une autre marque de la maturation ovocytaire dans le modèle qu'est l'ovocyte de porc. En présence de Na₂S à différentes concentrations la quantité de HA formée et retenue diminue de manière significative après 36 h, mais de façon non dépendante de la dose. L'expansion du cumulus pouvant être régulée par des facteurs provenant de l'ovocyte, la même expérience a été conduite sur des complexes ovocyte-cumulus dont l'ovocyte était privé de son cytoplasme. Dans ces expériences, aucune baisse de production de HA n'a été observée, ce qui indique que les effets du Na₂S sur l'expansion du cumulus passeraient par l'ovocyte et ne cibleraient pas directement les cellules du cumulus. Il a pu aussi être observé qu'il existait une diminution de l'expansion du cumulus.

5.3. L'inhibition conjointe des enzymes du métabolisme du H_2S entraine une inhibition de la maturation ovocytaire (article 4)

Des inhibiteurs des enzymes clés du métabolisme de l' H_2S ont été utilisés sur des ovocytes afin d'étudier le rôle de l' H_2S endogène dans la reprise méiotique des ovocytes de porc. L'AOAA, inhibiteur du CBS, est utilisé à une concentration de 2 mM ; le PAG, inhibiteur de CSE, à une concentration de 5 mM, et le KGA, inhibiteur de MPST, à 5 mM. Il a pu être observé que lorsque les inhibiteurs étaient utilisés de façon conjointe, la reprise méiotique des ovocytes de porc était inhibée de manière dose-dépendante.

5.4. L'inhibition conjointe des enzymes du métabolisme de l'H2S entraine la libération de HA dans le milieu (article 4)

Lorsque les enzymes du métabolisme du H₂S sont inhibées, aucune différence significative dans la quantité de HA produite n'est détectable après 24h de maturation. Cependant après 48h, une baisse la quantité de HA retenue dans les cellules du cumulus peut être observée et celui-ci est

relargué dans le milieu. Cela pourrait être dû à la modification de protéines (récepteurs) liant le HA dans les cellules du cumulus. Ces récepteurs sont classés en 3 groupes : CD44, RHAMM (Receptor for HA-mediated motility) et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Parmi celles-ci, la protéine CD44, une glycoprotéine de surface qui sert de récepteur au HA, est connue pour être impliquée dans la maturation ovocytaire (Kimura et al., 2002; Yokoo et al., 2002). Ainsi cette protéine pourrait être la cible du H₂S, cependant aucune preuve de sa S-Sulfhydration n'existe à ce jour.

6. Le H₂S module les profils d'activation du MPF et des MAPK

6.1. Voies MAPK dans le modèle de l'ovocyte de porc

Les MAPK sont sous forme inactives dans l'ovocyte de porc au stade VG. Elle augmente brusquement en MI et atteint son sommet au stade MII. Si dans l'ovocyte de xénope l'activation des MAPK est sujette à une réponse caractéristique tout ou rien, les ovocytes de mammifères présentent une réponse graduelle au stimulus extérieur. Les MAPK ne sont pas indispensables à la reprise de méiose en elle-même, mais l'activation de la cascade dans les cellules du cumulus est indispensable pour la reprise de méiose induit par la gonadotropine des ovocytes enfermés dans les cellules du cumulus (CEOs). Les MAPK ne sont pas requises pour l'induction de la GVBD des ovocytes dénudés, mais le sont pour les CEOs. De la même manière que dans les ovocytes de xénope l'activité MPF est suffisante pour activer la cascade des MAPK (Review : Ješeta & Bodart 2011).

6.2. L'activation du MPF et des MAPK est accélérée en présence de Na₂S

Les activités MAPK et MPF ont été mesurées au cours du temps par des tests d'activité kinasique. Ces tests se basent sur la capacité des kinases à fixer un ATP- γ -32P radioactif sur une cible spécifique : l'histone H1 pour le MPF et le MBP (Myelin Basic Protein) pour les MAPK. La quantité de substrats porteurs de phosphate radioactif reflète l'activité de ces 2 kinases.

En présence de Na₂S, les activités kinases de MAPK et du MPF sont significativement augmentées après 20h et 22h de cinétique respectivement.

6.3. L'activation du MPF et des MAPK est ralentie par l'inhibition conjointe des enzymes du métabolisme du H₂S (article 4)

De la même façon que précédemment, les activités kinasiques du MPF et des MAPK ont été mesurées au cours du temps sur des ovocytes maturés en présence d'inhibiteurs des enzymes du métabolisme de H₂S.

Ces expériences ont démontré une inhibition significative de l'activité kinasique du MPF et des MAPK à 24h.

7. Le Na₂S stimule la fécondation de l'ovocyte de porc (article 3)

L'influence du donneur de H_2S sur la fécondation et les premiers stades du développement jusqu'au stade blastula a été étudiée. Il en ressort qu'une concentration de 300 μ M de Na₂S

augmente de façon significative le pourcentage d'ovocytes activés, mais n'influence pas les stades précoces du développement. Le pourcentage d'embryons au stade morula et blastocyste à 7 jours a été relevé en conditions avec et sans Na₂S. Aucune différence significative n'existe entre ces deux conditions. Lorsque les ovocytes sont activés à l'aide d'un ionophore calcique on passe de 75,9% d'activation à 91,7% en présence de Na₂S 300 μ M.

Ainsi le H₂S semble donc impliqué dans la maturation des ovocytes de porc ainsi que dans l'expansion du cumulus. Il a notamment été observé que le H₂S entrainait une augmentation du profil d'activation des MAPKs. Cependant l'ensemble des évènements moléculaires impliqués dans ces phénomènes reste à déterminer.

Étude des effets de l'hydrogène sulfuré sur la maturation et l'activation de l'ovocyte de porc ainsi que sur le développement précoce des embryons

ARTICLE 3

Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes

Nevoral J¹, Petr J², **Gelaude A**³, Bodart JF³, Kucerova-Chrpova V¹, Sedmikova M¹, Krejcova T¹, Kolbabova T¹, Dvorakova M¹, Vyskocilova A¹, Weingartova I¹, Krivohlavkova L¹, Zalmanova T¹, Jilek F¹.

(PLoS One. 2014)

Dual Effects of Hydrogen Sulfide Donor on Meiosis and Cumulus Expansion of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes

Nevoral J¹, Petr J², Gelaude A³, Bodart JF³, Kucerova-Chrpova V¹, Sedmikova M¹, Krejcova T¹, Kolbabova T¹, Dvorakova M¹, Vyskocilova A¹, Weingartova I¹, Krivohlavkova L¹, Zalmanova T¹, Jilek F¹.

¹Czech University of Life Sciences in Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Veterinary Sciences, Prague, Czech Republic

²Research Institute of Animal Production, Prague, Czech Republic

³Université Lille1, Sciences et Technologies, Team Régulation des Signaux de Division – UMR 8576 CNRS, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

⁴Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czech Republic

⁵Czech University of Life Sciences in Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Chemistry, Prague, Czech Republic

⁶Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Pilsen, Biomedical Centre, Pilsen, Czech Republic

*Correspondence to: Jan Nevoral, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamycka 129, 16521 Prague 6-Suchdol, Czech Republic. Phone: +420 224 382 932. E-mail: <u>nevoral@af.czu.cz</u>

oocyte, GVBD, meiotic maturation, cumulus expansion, gasotransmitter, hydrogen sulfide

Abstract

Hydrogen sulfide (H₂S) has been revealed to be a signal molecule with second messenger action in the somatic cells of many tissues, including the reproductive tract. The aim of this study was to address how exogenous H₂S acts on the meiotic maturation of porcine oocytes, including key maturation factors such as MPF and MAPK, and cumulus expansion intensity of cumulusoocyte complexes. We observed that the H₂S donor, Na₂S, accelerated oocyte in vitro maturation in a dose-dependent manner, following an increase of MPF activity around germinal vesicle breakdown. Concurrently, the H₂S donor affected cumulus expansion, monitored by hyaluronic acid production. Our results suggest that the H₂S donor influences oocyte maturation and thus also participates in the regulation of cumulus expansion. The exogenous H₂S donor apparently affects key signal pathways of oocyte maturation and cumulus expansion, resulting in faster oocyte maturation with little need of cumulus expansion.

Introduction

Previously, molecules of some gases have been discovered to have biological activities. These gases, so called gasotransmitters, act as second messengers in the signal transduction of cell communication. In addition to the earlier observed nitric oxide and carbon monoxide, the role of hydrogen sulfide in cell metabolism has recently been studied [1]. Hydrogen sulfide (H₂S) is enzymatically released from aminoacid L-cystein by Cystathionine β -Synthase (CBS), Cystathionine γ -Lyase (CSE) and 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3-MPST) [2]–[4]. These enzymes are expressed in several tissues, including in the reproductive system [5]–[7], where it can be assumed that H₂S production mediates physiological functions. The presence and effect of CBS in the ovarian follicles of mice has been determined [8], [9]. The role of H₂S in oocyte maturation is not yet clear and has not been unravelled.

Successful meiotic maturation of oocytes is an important precondition of reproductive biotechnological progress. Only fully grown dictyate oocytes in germinal vesicle stage (GV-oocytes) undergo complete meiotic maturation and achieve metaphase II [10]. This process resumes after the hormonal stimuli action of the oocyte reinitiates meiotic division by the activation of key regulatory factors, such as Maturation/M-phase Promoting Factor (MPF) and Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), resulting in germinal vesicle breakdown (GVBD). Activation and correct kinesis of these factors are further necessary for meiosis I to II transition, organisation of the second meiotic metaphase spindle and spontaneous metaphase II-block [11]–[17]. The cytoplasmic changes of key factors of oocyte maturation are dependent upon intercellular communication between oocyte and surrounding cumulus cells [10]. On the other hand, mucification of the cumulus cells, known as cumulus expansion, causes a decrease of inhibitory substance flows into oocyte, especially cAMP, and restricted input of cAMP allows MPF activation, which triggers GVBD [18].

The cumulus expansion consists of synthesis and accumulation of glycosaminoglycans, especially hyaluronic acid, into the extracellular space [19]. Thus, cumulus expansion expressed by hyaluronic acid content may be a possible marker of successful GVBD, meiotic maturation and developmental competence acquisition in oocytes used for biotechnologies, i.e. in vitro fertilisation, transgenesis or cloning [20]–[23].

Meiotic maturation and cumulus expansion are simultaneously regulated by a complex network of several signal pathways including cAMP-PKA, Plk1-Cdc25-Cdc2, PI3K-Akt and Mos-MEK-MAPK [24]–[28]. Noticeably, the PI3K-Akt and cAMP-PKA pathways have been reported to be regulated by H₂S during the cell cycle of somatic cells [29]–[32]. Full knowledge of the molecular mechanisms of oocyte maturation and H₂S involvement in meiosis could improve the yield of successfully in vitro matured oocytes. We hypothesised that H₂S plays a role in the regulation of meiotic oocyte maturation. The aim of this study was to evaluate the influence of the H₂S donor on oocyte maturation, regulatory kinase activity in oocytes and the cumulus expansion intensity of porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) cultivated in vitro.

For this purpose, we tested the influence of the exogenous H_2S donor, Na_2S , on oocyte maturation, developmental competence acquisition and cumulus expansion of COCs. Here, we report for the first that the H_2S donor acts on oocytes to regulate cumulus expansion and progression through meiosis.

Materials and Methods

In Vitro Oocyte Cultivation with H₂S Donor

Porcine ovaries were obtained from non-cycling gilts at the local slaughterhouse (Jatky Plzen a.s., Plzen, Czech Republic). Ovaries were transported to the laboratory in a saline solution (0.9% NaCl) at 39°C. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from ovarian follicles with a diameter of 2 - 5 mm by a 20-gauge aspirating needle. Only fully grown oocytes with intact cytoplasm surrounded by compact cumuli were used in further experiments.

The COCs were matured in a modified M199 medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 32.5 mM sodium bicarbonate, 2.75 mM calcium L-lactate, 0.025 mg/mL gentamicin, 6.3 mM HEPES, 13.5 IU eCG: 6.6 IU hCG/mL (P.G.600; Intervet, Holland) and 5% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA). The culture medium contained 150, 300, 600 or 900 μ M Na2S.9H2O (Sigma-Aldrich, USA), the H₂S donor. The COCs were matured for 6–48 hs in 3.5 cm Petri dishes (Nunc) containing 3.0 ml of culture medium at 39°C in a mixture of 5.0% CO2 in air.

Evaluation of Oocyte Meiotic Maturation

At the end of culture, the COCs were treated with 1 mg/ml bovine testicular hyaluronidase (Sigma-Aldrich, USA) dissolved in M199 medium and cumulus cells were separated from oocytes by repeated pipetting through a narrow glass pipette. The oocytes were subsequently mounted on microscope slides with vaseline, covered with a cover glass, and fixed in ethanolacetic acid (3: 1 v/v) for at least 48 h. The oocytes were stained with 1.0% orcein in 50% aqueous-acetic acid and examined under a phase contrast microscope. Five groups of meiotic maturation stages were determined in accordance with the published criteria by Motlik et Fulka [33]: GV - germinal vesicle, LD - late diakinesis, MI - metaphase I, AITI - anaphase I to telophase I transition, MII - metaphase II.

Histone H1 and Myelin Basic Protein Double Assay

The COCs were matured for 12 - 48 hs with the H₂S donor. At each time interval during the culture, COCs were denuded and 10 oocytes per sample were collected. Assays were performed in accordance with the protocol of Kubelka et al. [34], with slight modifications. Briefly, the oocytes were washed four times in 0.01% polyvinyl alcohol in PBS, and transferred into 5 µl of buffer containing 40 mM 3-[n-morpholino] propanesulfonic acid pH 7.2, 20 mM paranitrophenyl phosphate, 40 mM β-glycerolphosphate, 10 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.2 mM Na3VO4, 2 mM benzamidine, 40 µg/mL leupeptin and 40 µg/mL aprotinin. Samples were immediately frozen and stored in Eppendorf tubes at -80° C until assays were performed. An assay of MPF and MAP kinase activity by their capacity to phosphorylate external substrates, specifically histone H1 (H1) and Myelin Basic Protein (MBP), was performed. The kinase reaction was initiated by addition of 5 µl of buffer consisting of 100 mM 3-[n-morpholino] propanesulfonic acid pH 7.2, 20 mM EDTA, 5 µM cAMP-

dependent protein kinase inhibitor, 2 mM benzamidine, 40 μ g/mL leupeptin, 40 μ g/mL aprotinin, 600 μ M ATP, 2 mg H1/ml, 3 mg MBP/mL) and 500 μ Ci/mL [γ -32P]ATP (GE Healthcare Life Sciences, UK). The reaction was conducted for 30 min at 30°C and terminated by the addition of 10 μ l Laemmli sample buffer and boiling for 3 min. After electrophoresis on 15% SDS PAGE gels, it was stained with Coomasie Blue R250, destained overnight, dried and autoradiographed. Phosphorylated histone H1 and MBP signals were visualised by MultiGauge 2.0 software and related to metaphase I oocytes after 24 h cultivation, where we expected the peak of kinase activity [34].

Oocytectomy and OOXs Cultivation

The COCs obtained using the above-detailed procedure were oocytectomised in accordance with Prochazka et al. [35]. Each COC was immobilised with a holding pipette. A glass needle was then introduced through the cumulus cells and the oocyte into the holding pipette, allowing the ooplasm to be sucked into the holding pipette. After withdrawal of the needle, the ooplasm, but not the zona pellucida, was aspirated into the holding pipette by a burst of a negative pressure. The technique was performed in a drop of culture medium covered by mineral oil in a Petri dish. A set of 25 oocytectomised complexes (OOXs) was prepared within 30 min and immediately placed into the culture. The further cultivation of OOXs took place under the already described conditions.

Hyaluronic Acid Assay

Groups of 25 COCs or OOXs were cultured for 12-48 hs in 1 ml culture modified M199 medium. The culture medium with cumulus cells after denuding of oocytes, or with OOXs, was placed into an Eppendorf tube and centrifugated at 10 000 rpm for 10 min. Cell pellets were proteolytically digested by 30 µl Alcalase 2.4 L FG in PBS (1: 100 v/v, Novozymes, Denmark) for 2 hs and thereafter 30 µl Flavourzyme 1000 L (1: 100 v/v, Novozymes, Denmark) was added and the mixture was cultured for a further 3 hs. The reaction was terminated by boiling for 3 min and the samples were stored at -20°C until the assay was performed. In addition to cell pellet digestion, the aliquots of culture medium for hyaluronic acid measurement were prepared. The HA content was ascertained by enzyme-linked immunosorbent assay. The QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay detection kit (Biotech, USA) was used to determine it. The amount of HA was measured spectrophotometrically on a microtitration plate using a Rainbow ELISA plate reader (wavelength 540 nm). The quadratic calibration curve was based on five standard concentrations of HA. Synthesis of HA was expressed either as the total HA production (HA content in cell pellet and medium) or the retained HA (HA content in cell pellet only). For each concentration of H₂S donor and point of time scale, the measured values of total HA were related to the control group of oocytes after 48 h cultivation.

Parthenogenetic Activation of Oocytes

Oocytes were partenogenetically activated using our previously published protocol [36]. Briefly, oocytes were matured in vitro for 44 and 46 hs with and without the H_2S donor, respectively. After in vitro maturation, oocytes were denuded and activated for 5 min with 25

 μ M calcium ionophore A23185. After activation, the oocytes were cultured for 2 hs with 2 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP) in NCSU23 medium [37]. The oocytes were then cultured for 24 hs or 7 days in four-well Petri dishes (Nunc) containing 1.0 ml of culture medium under described conditions. Subsequently, oocytes were fixed and stained as described above. Oocytes with pronuclei were considered to be activated. In a separate experiment after oocyte activation, the presumptive zygotes were cultured for 7 days. The cleavage rate and blastocyst achievement was assessed after 2 and 7 days of culture, respectively.

Statistical Analysis

Our data are from at least the e independent experiments. The general linear models (GLM) procedure in SAS software (SAS Institute Inc., USA) was used to analyse data from all experiments. Significant differences between groups were determined using the t-test. The level of significance was set at P<0.05.

Results

1. H₂S Donor Accelerates Oocyte Maturation in a Dose-Dependent Manner

We evaluated the influence of different concentrations of H_2S donor on the nuclear maturation of porcine oocytes after 20 and 30 hs of in vitro cultivation. Time points of 20 and 30 hs were selected to represent more meiotic stages.

No effect of the H₂S donor Na₂S for the lowest concentration of 35 μ M was observed after 20 and 30 h cultivation. With increasing concentration of Na2S accelerating GVBD (75.0–80.0 vs. 68.3% for H₂S donor and control, respectively) after 20 h cultivation, the differences were statistically significant (Figure 1A, Table S1a). With higher concentration of the H₂S donor, acceleration of meiosis I to II transition in oocytes was observed after 30 h cultivation (Figure 1B). As such, these oocytes achieved meiosis II with statistical differences in 77.5 and 86.7% of cases for 150 and 300 μ M Na2S, respectively (see more in Table S1b).

2. H₂S Donor Accelerates Porcine Oocyte Maturation

We evaluated the influence of H_2S donor Na2S on nuclear maturation of porcine oocytes during in vitro cultivation over a 2 h time scale. We monitored the effect of 300 μ M Na₂S on germinal vesicle breakdown (GVBD). An accelerated decline of the amount of germinal vesicle (GV) oocyte together with GVBD increase were statistically significant after 14–20 h cultivation (Figure 2A). Moreover, H₂S donor-treated oocytes reached faster meiosis II than the control ones (Figure 2B). The complete data are provided in Table S2.

3. MPF and MAPK Activity Profiles Are Accelerated by H2S Donor

To further characterise the effect of H_2S on oocyte maturation, a kinase activity assay was performed (Figure 3A, 3B, Figure S1). We observed the influence of H2S donor, Na2S, in 300 μ M concentration on the beginning of MPF and MAPK activity around GVBD over a 2 h time scale. Data were expressed relative to MPF/MAPK activity in oocytes cultivated for 24 h where it is predictable that kinase activity is the highest. The phosphorylated histone H1 and MBP signal intensities reflecting the MPF and MAPK activity profile, respectively, were increased and accelerated by the H₂S donor during oocyte maturation. The difference in MAPK activity between the control and H₂S groups was statistically significant after 20 h in vitro cultivation. During further in vitro maturation, significant acceleration of MPF occurred after 22 h cultivation.

4. H₂S Donor Can Substitute for the Absence of Cumulus Cells

Denuded oocytes (DOs) were cultured with the H_2S donor to evaluate cumulus cells' role during accelerated meiotic maturation. The aim of the experiment was to evaluate the GVBD and meiosis I to II transition of oocytes cultivated with 300 μ M Na₂S for 20 and 30 hs, respectively. No effect of Na2S on GVBD rates of DOs after 20 hs was observed. It should also be noted that in comparison to the control, more H_2S -treated DOs reached nuclear stages of meiosis II after 30 hs (69.2 vs. 35.8% for H_2S donor and control of DOs, respectively), see Figure 4. In addition,

more DOs cultured with the H_2S donor reached metaphase II (30.0%) in comparison with the control DOs and COCs (16.7 and 6.7%, respectively) and even COCs cultured with the H_2S donor (15.8%). Further data are available in Table S3a and S3b.

5. H₂S Donor Influences Cumulus Expansion with Presence of Oocytes

The aim of the experiment was to measure cumulus expansion by hyaluronic acid (HA) content in COCs and OOXs. The total HA production was assessed by HA content released into the culture medium and by retained HA in cell lysate. The total and retained HA was measured in COCs after 48 h in vitro cultivation and during maturation after 12, 24, 36 and 48 hs. The results are compared to control COCs after 48 h cultivation. It was observed that H₂S donor, Na₂S, inhibited total HA production after 48 hs by 21.9–34.6%. No dose-dependent manner was observed, differences are statistically significant (Figure 5A). For further experiments, a concentration of 300 μ M Na₂S was used.

HA production during in vitro cultivation of COCs is low after 12 hs of cultivation and it increased after 24 hs without significant differences between the control and H_2S groups. The H_2S donor significantly inhibited total HA production after 36 and 48 h cultivation by 13.0 and 29.0%, respectively (Figure 5B).

To evaluate the influence of oocyte presence on HA production and cumulus expansion, oocytectomised complexes (OOXs) were cultivated with the H_2S donor for 48 hs. It was found that oocytectomisation reduced total HA in OOXs cultivated in a pure medium by 37.0%. HA production by OOXs cultivated with H_2S donor decreased with no statistical significance in comparison with the above-mentioned OOXs. The data are shown in Figure 5C.

6. H₂S Donor Increases Activation Rate but It Has No Effect on Parthenogenetic

Development

The influence of the H₂S donor on developmental competence acquisition during in vitro oocyte maturation was examined. The oocytes were matured with 300 μ M Na2S and in pure medium for 44 and 46 hs, respectively, when 100% of oocytes in both group were matured (see Table S2). The H₂S donor in maturation medium significantly increased the activation rate (91.7 vs. 75.8% for H₂S donor and control, respectively). The cleavage rate, morula and blastocyst formation were not influenced (Table 1).

Discussion

In this study, we observed the relevant impact of the exogenously added H_2S donor on porcine oocyte maturation. Originally, H_2S was described as a toxic gas [38]. However, H_2S is also endogenously generated in many types of mammalian cells, where it acts as a signal molecule, known as a gasotransmitter [2]. The concentrations of H_2S donor we used are comparable to physiological values in tissues [2], [3] and we could assume that the observed effects of H_2S donor exogenously added were not a result of its toxicity but rather relied on the physiological effect of H_2S as a gasotransmitter. To the best of our knowledge, this study is the first one to describe the influence of the H_2S donor on meiotic maturation of oocytes.

ignificant acceleration of oocyte maturation during in vitro cultivation of porcine cumulusoocyte complexes (COCs) with the H₂S donor was observed. In agreement with a former study [34], meiotic maturation of oocytes was accelerated by an earlier increase of MPF and MAPK regulating oocyte maturation. The mechanisms underlying this precocious activation of MPF/MAPK induced by H₂S remain to be determined. It is known that H₂S can influence the activity of various factors including kinases by their direct sulfhydration [39], but no direct effect of H₂S on MPF and MAPK activities has been yet reported. In addition to possible direct regulation, H₂S may act indirectly on kinase activity by modifying other molecules, such as ion channels [40], and/or through regulation of up-stream kinases [30], [31]. Thus, the sulfhydration of these proteins may tune and control the oocyte maturation processes. In somatic cells, H₂Sstimulation of signal pathways of cAMP/PKA [32] and PI3K/Akt [31] was observed. The important contribution these signal pathways make to kinase activity control during mammalian oocyte maturation is known [10], [41]. The experiments undertaken demonstrate that the H₂S donor does not suppress acquisition of oocyte developmental competence during their in vitro maturation.

In our experiments, the action of the H_2S donor on oocyte maturation in porcine COCs poses the question of whether the H_2S donor effect is the result of direct function in oocytes, or whether the action of exogenous H_2S is transduced by cumulus cells. Our results suggest that the H_2S donor acts directly on the oocyte. Indeed, accelerated maturation by the H_2S donor was observed in denuded oocytes (DOs) cultivated after removal of cumulus cells. The acceleration of meiotic maturation in H_2S donor treated DOs was even more marked than in treated COCs. An explanation for this phenomenon could be in exogenous H_2S retention in cumulus cells and/or in the extracellular matrix produced by these cells. This results in a smaller quantity of H_2S being available for the oocytes. In addition, the H+S donor may cause processes inhibiting oocyte maturation in cumulus cells [42]. Accordingly, the immediate H_2S donor influence induces faster meiotic maturation of DOs.

The influence of the H_2S donor on cumulus cells was demonstrated by our subsequent experiments, in which we measured the level of hyaluronic acid (HA) in the extracellular matrix of cumulus cells as a marker of cumulus expansion. We showed inhibition of HA production in COCs cultivated with the H_2S donor. The effect of the H2S donor on HA production was observed in all the concentrations of the H2S donor used after 48h in vitro cultivation. The H_2S donor significantly influenced HA production in the second moiety of COC cultivation. A

previous study had illustrated the decrease in activity of factors stimulating cumulus expansion, such as Cumulus Expansion Enabling Factor (CEEF), after metaphase I attainment [43]. We can presume that the role of the H_2S donor may be in the deepening of CEEF decrease. The mechanism of H_2S effect on cumulus expansion is as yet unclear. One possibility could be the influence of the above-mentioned cAMP/PKA signal pathway [32], which regulates cumulus expansion [44].

Cumulus expansion is extensively regulated by substances with oocyte origin [43], [44]. For this reason, we evaluated the influence of oocyte presence on cumulus expansion during cultivation with the H₂S donor. We measured HA production in oocytectomied complexes (OOXs) where the oocyte had been removed. Our observation of decreased HA production after oocytectomy is in line with the previous study [45], where a decline of HA-synthase 2 expression in cumulus cells was shown. Whereas we demonstrated the inhibition of HA production in intact COCs cultivated with the H₂S donor, no effect was observed in OOXs. It is known that production of CEEF by porcine cumulus cells is sufficient for cumulus expansion [35]. However, our experiments showed that inhibition of cumulus expansion by the H₂S donor is mediated by the oocyte. Target systems in oocytes for H₂S, regulating HA production in this way, remain unknown. Presumably, possible target molecules for exogenous H₂S might be some members of the Transforming Growth Factor β superfamily which can be regulated by H₂S [46] and subsequently influence HA-synthase 2 activity in cumulus cells [47].

The results of our study demonstrate that the H_2S donor can participate in the regulation of oocyte maturation and cumulus expansion without the interference of developmental competence acquired during in vitro maturation. Further experiments are necessary for a full explanation of the role of H_2S as a signal molecule and the mechanism of its effect during oocyte maturation, cumulus expansion and early embryogenesis.

Figures and Legends



Figure 1: Effect of different Na2S concentrations on meiosis resumption and transition to meiosis II in oocytes. Proportion of GVBD (A) and meiosis I to II transition (B) during in vitro cultivation after 20 and 30 h in vitro cultivation, respectively. a,b,cStatistically significant differences among experimental groups (P<0.05).



Figure 2: Effect of Na2S on meiotic resumption and transition to meiosis II during oocyte cultivation. Proportion of GVBD (A) and meiosis I to II transition (B) in oocytes during in vitro cultivation over 2 h time scale. H2S: 300 µM Na2S.



Figure 3: Effect of Na2S on MPF and MAPK activities during oocyte cultivation. Representative autoradiograms and signal quantifications of phosphorylated histone H1 (A) and MBP (B) reflecting MPF and MAPK activity, respectively. Kinase activity was measured in oocytes cultivated with or without Na2S over 2 h time scale. The kinase activity was related to oocytes cultivated for 24 hs. C: control; H2S: 300 µM Na2S. *Statistically significant differences between control and H2S groups



Figure 4: Effect of Na2S on meiosis resumption and transition to meiosis II in DOs. Proportion of GVBD (A) and meiosis I to II transition (B) during in vitro cultivation after 20 and 30 h in vitro cultivation, respectively. H2S: 300 μ M Na2S. a,b,cStatistically significant differences among experimental groups (P<0.05).



Figure 5: Effect of Na2S on HA content in expanded cumulus. (A) Total and retained HA content in COCs cultivated with 150–900 μ M Na2S for 48 hs, total HA is related to the control group. (B) Total and retained HA content in COCs during in vitro cultivation with 300 μ M Na2S over 12 h time scale, total HA is related to the control group after 48 h cultivation. (C) Total and retained HA content in COCs and OOXs cultivated with or without H2S donor, total HA is related to the control group of COCs. H2S: 300 μ M Na2S. a,b,cStatistically significant differences among experimental groups in total HA, 1,2statistically significant differences among experimental groups in total HA, total HA between control and H2S groups (P<0.05).

	Activation rate (24 hs)	n	Cleavage rate (2days)	Stage of early embryonic development (7 days)		n
				Morula	Blastocyst	
control	75.8±3.2	120	63.3±7.2	26.7±7.2	23.3±2.7	120
H_2S	91.7±3.3*	120	70.8±5.0	30.8±1.7	25.0±4.3	120

Table 1: Effect of Na2S on partenogenetic development of porcine oocytes. Oocytes were matured with or without Na2S and partenogenetically activated using calcium ionophore. Pronucleus formation after 24 h zygote culture, cleavage rate after 2 days and blastocyst achievement after 7 days presumptive embryos culture were evaluated (%±SE). H2S: 300 μ M Na2S during oocyte maturation. *Statistically significant differences between control and H2S group – in column (P<0.05).

References

1. Geng B, Cai B, Liao F, Zheng Y, Zeng Q, et al. (2013) Increase or decrease hydrogen sulfide exert oposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. PLoS ONE 8: e73892.doi:10.1371/journal.pone.0073892 [PMC free article] [PubMed]

2. Wang R (2002) Two is company, free is a crowd – Can H2S be the third endogenous gaseous transmitters? FASEB J 16: 1792–1798 [PubMed]

3. Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasa-Wara Y, Togawa T, et al. (2009) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. Antioxid Redox Signal 11: 703–714 [PubMed]

4. Zhao H, Chan S-J, Ng Y-K, Wong PT-H (2013) Brain 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST): cellular localization and downregulation after acute stroke. PLoS ONE 8: e67322.doi:10.1371/journal.pone.0067322 [PMC free article] [PubMed]

5. Ghasemi M, Dehpour AR, Moore KP, Mani AR (2012) Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. Biochem Pharmacol 83: 1261–1268 [PubMed]

6. Guzman MA, Navarro MA, Carnicer R, Sarria AJ, Acin S, et al. (2006) Cystathionine β -synthase is essential for female reproductive function. Hum Mol Genet 15: 3168–3176 [PubMed]

7. Srilatha B, Hu LX, Adaikan GP, Moore PK (2009) Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. J Sex Med 6: 1875–1884 [PubMed]

8. Liang R, Yu WD, Du JB, Yang LJ, Shang M, et al. (2006) Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. Chinese Med J 119: 1877–1883 [PubMed]

9. Liang R, Yu WD, Du JB, Yang LJ, Yang JJ, et al. (2007) Cystathionine β synthase participates in murine oocytes maturatione mediated by homocysteine. Reprod Toxicol 24: 89–96 [PubMed]

10. Wassarman PM (1988) The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill J, editors. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press. 69–102.

11. Hampl A, Eppig JJ (1995) Analysis of the mechanism(s) of metaphase-I arrest in maturing mouse oocytes. Development 121: 925–933 [PubMed]

12. Motlik J, Fulka J (1976) Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. J Exp Zool 198: 155–162 [PubMed]

13. Motlik J, Kubelka M (1990) Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. Mol Reprod Dev 27: 366–375 [PubMed]

14. Peter M, Castro A, Lorca T, Le Peuch, C, Magnaghi- Jaulin L, et al. (2001) The APC is dispensable for first meiotic anaphase in Xenopus oocytes. Nat Cell Biol 3: 83–87 [PubMed]

15. Rolfe M, Chiu M, Pagano M (1997) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. J Mol Med 75: 5–17 [PubMed]

16. Verlhac MH, De Pennhart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ (1993) MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centres during meiotic maturation of mouse oocytes. Dev Biol 158: 330–340 [PubMed]

17. Verlhac MH, Kubiac JZ, Clarke HJ, Maro B (1994) Microtubule and chromatin behaviour follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. Development 120: 1017–1025 [PubMed]

18. Downs SM, Hunzickerdunn M (1995) Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine-monophosphate. Dev Biol 172: 72–85 [PubMed]

19. Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1989) Synthesis and acumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. J Biol Chem 264: 13840–13847 [PubMed]

20. Han ZB, Lan GC, Wu YG, Han D, Feng WG, et al. (2006) Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. Reproduction 132: 749–758 [PubMed]

21. Jezova M, Scsukova S, Nagyova E, Vranova J, Prochazka R, et al. (2001) Effect of intraovarian factors on porcine follicular cells: cumulus expansion, granulosa and cumulus cells progesterone production. Animal Reprod Sci 65: 115–126 [PubMed]

22. Nemcova L, Nagyova E, Petlach M, Tomanek M, Prochazka R (2007) Molecular mechanisms of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine oocyte-cumulus complexes. Biol Reprod 76: 1016–1024 [PubMed]

23. Yokoo M, Kimura N, Sato E (2010) Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. J Reprod Dev 56: 15–19 [PubMed]

24. Anger M, Klima J, Kubelka M, Prochazka R, Motlik J, et al. (2004) Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. Mol Reprod Dev 69: 11–16 [PubMed]

25. Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG (2009) Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus-oocyte complexes during IVM. Reprod Fert Develop 1: 796–804 [PubMed]

26. Fan HY, Li MY, Tong C, Chen DY, Xia GL, et al. (2002) Inhibitory effect of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. Mol Reprod Dev 63: 480–487 [PubMed]

27. Kalous J, Kubelka M, Solc P, Susor A, Motlik J (2009) Akt (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. Reproduction 138: 645–654 [PubMed]

28. Yamashita Y, Hishinuma M, Shimada M (2009) Activation PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. J Ovarian Res 2: doi:10.1186/1757-2215-2-20. [PMC free article] [PubMed]

29. Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou ZM, Pyriochou A, et al. (2010) Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. Art Thromb Vasc Biol 30: 1998–U254 [PubMed]

30. Hu Y, Chen X, Pan TT, Neo KL, Lee SW, et al. (2008) Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. Pflugers Arch-Eur J Physiol 455: 607–616 [PubMed]

31. Huang Y, Li F, Tong WD, Zhang AP, He YJ, et al. (2010) Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of intestinal cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein. Tohoku J Exp Med 221: 125–132 [PubMed]

32. Njie-Mbye YF, Kulkarni M, Opere CA, Ohia SE (2012) Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. Exp Eye Res 98: 16–22 [PubMed]

33. Motlik J, Fulka J (1986) Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. Theriogenology 25: 87–96

34. Kubelka M, Motlik J, Schultz RM, Pavlok A (2000) Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. Biol Reprod 62: 292–302 [PubMed]

35. Prochazka R, Nagyova E, Rimkevicova Z, Nagai T, Kikuchi K, et al. (1991) Lack of effect of oocytectomy on expansion of the porcine cumulus. J Reprod Fert 93: 569–576 [PubMed]

36. Jilek F, Huttelova R, Petr J, Holubova M, Rozinek J PLoS ONE

Étude des effets de l'hydrogène sulfuré sur la maturation et l'activation de l'ovocyte de porc ainsi que sur le développement précoce des embryons

ARTICLE 4

Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in

vitro

Nevoral J¹, Žalmanová T¹, Zámostná K¹, Kott T², Kučerová-Chrpová V¹, Bodart JF³, **Gelaude A**³, Procházka R⁴, Orsák M⁵, Klein P⁶, Dvořáková M¹, Weingartová I¹, Víghová A¹, Krejčová T¹, Hošková K¹, Němeček D¹, Pacholíková L¹, Chmelíková E¹, Jílek F¹, Petr J² (Article en préparation)

Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro

Jan Nevoral^{1*}, Tereza Žalmanová¹, Kateřina Zámostná¹, Tomáš Kott², Veronika Kučerová-Chrpová¹, Jean-Francois Bodart³, Armance Gelaude³, Radek Procházka⁴, Matyáš Orsák⁵, Miloslav Šulc⁵, Pavel Klein⁶, Markéta Dvořáková¹, Ivona Weingartová¹, Aurélia Víghová¹, Kristýna Hošková¹, Tereza Krejčová¹, František Jílek¹, Jaroslav Petr²

¹Czech University of Life Sciences in Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Veterinary Sciences, Prague, Czech Republic

²Research Institute of Animal Production, Prague, Czech Republic

³Université Lille1, Sciences et Technologies, Team Régulation des Signaux de Division – UMR 8576 CNRS, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

⁴Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czech Republic

⁵Czech University of Life Sciences in Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Chemistry, Prague, Czech Republic

⁶Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Pilsen, Biomedical Centre, Pilsen, Czech Republic

*Correspondence to: Jan Nevoral, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamycka 129, 16521 Prague 6-Suchdol, Czech Republic. Phone: +420 224 382 932. E-mail: <u>nevoral@af.czu.cz</u>

oocyte, GVBD, meiotic maturation, cumulus expansion, gasotransmitter, hydrogen sulfide

Abstract

Hydrogen sulfide, one of three known gasotransmitters, is involved in physiological processes, including reproductive functions. Oocyte maturation and surrounding cumulus cell expansion play an essential role in female reproduction and subsequent embryonic development. Although the positive effects of exogenous hydrogen sulfide on maturing oocytes are well known, the role of endogenous hydrogen sulfide, which is physiologically released by enzymes, has not yet been described in oocytes. In this study, we observed the presence of Cystathionine β -Synthase (CBS), Cystathionine γ -Lyase (CTH) and 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3-MPST), hydrogen sulfide-releasing enzymes, in porcine oocytes. Endogenous hydrogen sulfide production was detected in immature and matured oocytes as well as its requirement for meiotic maturation. Individual hydrogen sulfide-releasing enzymes seem to be capable of substituting for each other in hydrogen sulfide production. However, meiosis suppression by inhibition of all hydrogen sulfide-releasing enzymes is not irreversible and this effect is a result of M-Phase/Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) activity inhibition. Futhermore, cumulus expansion expressed by hyaluronic acid (HA) production is affected by the inhibition of hydrogen sulfide production. Moreover, quality changes of the expanded cumuli are indicated. These results demonstrate hydrogen sulfide involvement in oocyte maturation as well as cumulus expansion. As such, hydrogen sulfide appears to be an important cell messenger during mammalian oocyte meiosis and adequate cumulus expansion.

Introduction

Meiosis in mammalian oocytes is spontaneously arrested at the dictyotene of prophase I. Prior to this, growing oocytes synthesise large amounts of protein essential for the resumption of this meiotic block, which is followed by oocyte meiosis [1]. A fully-grown dictyate oocyte, often called a germinal vesicle (GV) oocyte, holds the meiotic block until gonadotropin stimulation *in vivo* and *in vitro* conditions, when the re-initiation of oocyte meiosis is manifested as germinal vesicle breakdown (GVBD). GVBD is followed by further stages of meiosis I and the establishment of the second meiotic block at metaphase II (MII). The process that begins with GVBD and continues through meiosis I to MII is called meiotic maturation. Oocyte maturation is necessary for fertilisation ability and successful embryonic development [2]. Therefore, oocyte maturation is a key factor in female fertility as well as in assisted reproductive therapy.

Cumulus cells surround the oocyte, and together, they create a cumulus-oocyte complex (COC). Oocyte maturation is accompanied by an increased production of extracellular matrix compounds in the cumulus cells mass [3,4]. COC enlargement associated with mucification, known as cumulus expansion, is based on the production of glycosaminoglycans, especially hyaluronic acid [5,6]. Expanded cumuli prevents the flow of certain meiosis inhibiting factors to the oocyte [7,8]. Moreover, HA itself acts as a signal molecule regulating oocyte maturation [9,10]. These changes result in the activation of key cell cycle kinases that are pivotal for oocyte maturation: M-Phase/Maturation Promoting Factor (MPF) and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) [11,12]. The ways in which up-stream factors regulate MPF/MAPK-driven oocyte maturation are not yet fully understood. Based on our recent observations, a potent group of gasotransmitters, gaseous molecules with second messenger action, are evidently involved in the regulation of oocyte metabolism [13,14].

Of the three described gasotransmitters - nitric oxide, hydrogen sulfide and carbon monoxide -, only the role of nitric oxide has been more detail studied in oocyte maturation and cumulus expansion [summarised in 15]. In addition to nitric oxide, endougenously released hydrogen sulfide is also required for the regulation of many cell functions [summarised in 16,17]. However, the role of hydrogen sulfide in oocyte maturation and cumulus expansion remains unclear. Nevertheless, the accelerational effect of sodium sulfide, an exogenous hydrogen sulfide donor, on MPF/MAPK activity and oocyte maturation was recently described. Moreover, this hydrogen sulfide donor also influences hyaluronic acid (HA) production and cumulus expansion [13]. This indicates that endogenous production of hydrogen sulfide may play a physiological role in the regulation of oocyte maturation and cumulus expansion. Endogenously releasing hydrogen sulfide from amino acid L-cystein is catalysed by pyridoxal phosphate-dependent enzymes: Cystathionine β -Synthase (CBS), Cystathionine γ -Lyase (CTH) and/or 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3-MPST) [18,19]. CBS is the only hydrogen sulfide-releasing enzyme to be observed in ovarian follicles [20,21]. Neither the physiological production of hydrogen sulfide nor the presence of CTH and 3-MPST has been indicated in oocytes.

We hypothesise that three hydrogen sulfide-releasing enzymes, CBS, CTH and 3-MPST, are present in mammalian oocytes and produce endogenous hydrogen sulfide, which is involved in the regulation of oocyte maturation and cumulus expansion. The aims of the present study consisted of the following: 1) to detect mRNA for CBS, CTH and 3-MPST in pig oocytes and cumulus cells; 2) to localise CBS, CTH and 3-MPST proteins in pig oocytes during oocyte maturation; 3) to demonstrate the effects of inhibitors of these hydrogen sulfide-releasing enzymes on pig oocyte maturation; 4) to measure MPF and MAPK activity in oocytes; and 5) to evaluate cumulus expansion based on HA production.

Materials and Methods

Oocyte isolation and in vitro maturation

Porcine ovaries were obtained from 6- to 8-month-old non-cycling gilts (a crossbreed of Landrace x Large White), at the local slaughterhouse (Jatky Plzen a.s., Plzen, Czech Republic) and kept at 39 °C until arrival to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from ovarian follicles with a diameter of 2–5 mm by a 20-gauge aspirating needle. Only fully grown oocytes with intact cytoplasm, surrounded by compact cumuli, were selected for experiments.

The COCs were matured in a modified M199 medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 32.5 mM sodium bicarbonate, 2.75 mM calcium L-lactate, 0.025 mg/mL gentamicin, 6.3 mM HEPES, 13.5 IU eCG: 6.6 IU hCG/mL (P.G.600; Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) and 5% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA). The culture medium contained oxamic acid, DL-propargylglycine and/or α -ketoglutaric acid, specific inhibitors of CBS, CTH and 3-MPST, respectively, in double- or triple-combination. An effective concentration of the triple-combination of inhibitors (2 mM oxamic acid, 2 mM DL-propargylglycine and 5 mM α -ketoglutaric acid dissolved in M199 medium; 3C_i) was used for subsequent experiments. The COCs were matured for 16–48 h in 4-well Petri dishes (Nunc, Fisher Scientific, USA) containing 1.0 ml of culture medium, at 39 °C in a mixture of 5.0% CO₂ in air.

Assessment of oocyte meiotic maturation

At the end of culture, the COCs were treated with 0.1% bovine testicular hyaluronidase (Sigma-Aldrich, USA) dissolved in M199 medium and cumulus cells were separated from oocytes by repeated pipetting through a narrow glass pipette. Subsequently, the oocytes were mounted on microscope slides with vaseline, covered with a cover glass, and fixed in ethanol-acetic acid (3:1, v/v) for at least 48 h. The oocytes were stained with 1.0% orcein in 50% aqueous-acetic acid and examined under a phase contrast microscope. Five groups of meiotic maturation stages were determined in accordance with the published criteria by Motlik and Fulka [22]: GV - germinal vesicle, LD - late diakinesis, MI - metaphase I, AITI - anaphase I to telophase I transition, MII - metaphase II.

Real time RT-qPCR analysis

The samples for quantitative Real Time RT-qPCR analysis of CBS, CTH and 3-MPST mRNAs were prepared from growing oocytes, fully grown immature (GV), maturing (MI) and matured (MII) oocytes. Concurrently, cumulus cells were used for the same analysis.

RNA was isolated using a NucleicAcid PrepStation 6100 (Applied Biosystems, Fisher Scientific, USA) in accordance with the instruction manual. Total mRNA was transcribed to cDNA with a High-Capacity cDNA Achieve kit (Applied Biosystems, USA) in accordance with manufacture instructions. cDNA was synthesised in a final volume of 100 μ l. Sets of specific primers were synthesised in accordance with known sequences to amplify specific products for CBS, CTH and 3-MPST (Table 1).

Real-time PCR was performed using a standard Taq-Man PCR kit protocol (Applied Biosystems, USA). Each PCR reaction was performed in triplicate in a total volume of 10 µl with a 500 nM gene-specific primer and 200 nM TaqMan MGB probes, 5 µl of 2x concentrated Fast TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA), 1 µl cDNA, and nuclease-free water up to volume. The 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) was utilised for RT-qPCR reactions and the programme used was as follows: 95 °C for 20 sec followed by 40 cycles of 95 °C for 2 sec and 60 °C for 20 sec.

The relative quantification of mRNA expression for each enzyme was determined with data from SDS software using the arithmetical formula $2^{-\Delta\Delta CT}$, according to the comparative Ct method [23], representing the amount of target, normalised to the GAPDH endogenous control as reference [24] and related to fully grown GV oocytes and their cumulus cells.

Immunocytochemistry and image analysis

GV, MI and MII oocytes were denuded from cumulus cells, fixed and processed as early described Yi *et al.* [25]. Briefly, oocytes were incubated with rabbit polyclonal anti-CBS (ab96252, 1:200; Abcam, UK), rabbit polyclonal anti-CTH (sc-135203, 1:200; Santa-Cruz Biotechnology, USA;) or rabbit polyclonal anti-3-MPST (ab85377, 1:200; Abcam, UK) overnight at 4 °C. Subsequently, the oocytes were washed twice before being incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit (GAR) IgG (1:200; Invitrogen, Fisher Scientific, USA) for 40 min at room temperature. Thereafter, the oocytes were washed twice and mounted into a Vectashield with 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector

Laboratories, USA). Images were acquired using the Ti-U microscope (Nikon, Japan) with Clara Interline CCD camera (Andor Technology PLC, Northern Ireland) operand by NIS Elements Ar software (Nikon, Japan). Negative controls were performed by omitting specific antibodies and these slides were processed at comparable settings. Image analysis, along with 2D deconvolution, was performed by NIS Elements and signal intensity of CBS, CTH or 3-MPST, reduced by a basal signal intensity of appropriate negative control processed by equal procedures.

Western blotting

GV, MI and MII oocytes and their cumulus cells were used for western blot analysis. Samples were prepared and processed using the method set out by Tumova et al. [26], with slight modifications. In brief, after oocyte denudation, oocytes and cumulus cells were separately lysed in 20 µl of Laemmli buffer containing Triton-X-100 (0.003%, v/v) and SDS (0.001%, v/v), enriched with Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Switzerland). Samples were boiled and subjected to SDS-PAGE electrophoresis in 12.5% separating gels and blotted onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK). After overnight blocking in 2% non-fat milk in PBS with 0.1% Tween-20 (PBS-T), the membrane was incubated with rabbit polyclonal anti-CBS (ab96252, 1:500; Abcam, UK), rabbit polyclonal anti-CTH (sc-135203, 1:500; Santa-Cruz Biotechnology, USA;) or rabbit polyclonal anti-3-MPST (ab85377, 1:500; Abcam, UK) diluted in PBS-T for 60 min at room temperature. Subsequently, the membrane was incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti rabbit IgG in PBS-T (1:120,000; Invitrogen, USA) for 60 min at room temperature. CBS, CTH and 3-MPST recombinant proteins (H00000875-P01, H00001491-P01 and H00004357-P01, respectively; Abnova, Taiwan), with defined molecular weight, were used as a positive control for evidence of oocyte/cumulus CBS/CTH/3-MPST. Proteins were detected using the ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) and visualised by a C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA).

Histone H1 and myelin basic protein double assay

The COCs were matured for 16-36 h with or without the presence of the $3C_i$. At each alloted time interval during the culture, COCs were denuded and 15 oocytes per sample were collected.

Assays were performed according to the protocol of Kubelka et al. [11], with slight modifications. The oocytes were washed four times in PBS-PVA, and transferred into 5 µl of buffer containing 40 mM 3-[n-morpholino] propanesulfonic acid pH 7.2, 20 mM paranitrophenyl phosphate, 40 mM β-glycerolphosphate, 10 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 0.2 mM Na₃VO₄, 2 mM benzamidine, 40 µg/mL leupeptin and 40 µg/mL aprotinin. Samples were immediately frozen and stored at -80 °C until assays were performed. An assay of MPF and MAPK activity by their capacity to phosphorylate external substrates, histone H1 (H1) and Myelin Basic Protein (MBP), respectively, was performed. The kinase reaction was initiated by the addition of 5 µl of buffer consisting of 100 mM 3-[n-morpholino] propanesulfonic acid pH 7.2, 20 mM para-nitrophenyl phosphate, 40 mM β-glycerolphosphate, 20 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 5 µM cAMP-dependent protein kinase inhibitor, 2 mM benzamidine, 40 µg/mL leupeptin, 40 µg/mL aprotinin, 600 µM ATP, 2 mg H1/ml, 3 mg MBP/mL) and 500 µCi/mL [y-32P]ATP (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK). The reaction was conducted for 30 min at 30 °C and terminated by the addition of 10 µl Laemmli sample buffer and boiling for 3min. After electrophoresis on 15% SDS PAGE gels, it was stained with Coomasie Blue R250, destained overnight, dried and autoradiographed. Phosphorylated histone H1 and MBP signals were visualised by MultiGauge 2.0 software (FUJI FILM, Japan) and related to metaphase I oocytes of the control group after 24 h cultivation, where we expected the peak of kinase activity [13].

Spectrophotometric analysis of hydrogen sulfide production

Hydrogen sulfide production was evaluated by spectrophotometry in accordance with Abe and Kimura [27] with modifications due to porcine oocytes. Briefly, immature GV oocytes and matured MII oocytes after 48 h cultivation were denuded and divided into control and inhibited groups (150 oocytes per sample), with or without the addition of $3C_i$, respectively. The oocytes were processed to cell lysate by mechanical disruption in 500 µl cold reaction mixture consisting of 20 mM pyridoxal 5-phosphate and 1 mM L-cysteine in deionised water. After oocyte lysate preparation, 250 µl 1% zinc acetate was added and enzymatic hydrogen sulfide production was initiated by increasing the temperature to 39 °C. After 60 min incubation in an N₂ atmosphere, 250 µl 50% trichloracetic acid was added to ensure the enzymes were deactivated. The reaction mixture was incubated for the next 60 min under the same conditions, thereafter, 133 µl of 20 mM N,N dimethyl-p-phenylenediamine sulphate (in 7.2 M HCl) and 130 µl of 30 mM FeCl₃ (in 1.2 M HCl). The reaction mixture was centrifuged at 10,000 rpm

for 1 min and spectrofotometrically measured on a 96-well microtitration plate (wavelength 670 nm) to blank, using a Rainbow ELISA plate reader. The quadratic calibration curve was based on five Na₂S.9H₂O standards ($35 - 600 \mu$ M) and used for calculating the amount of lysate hydrogen sulfide. The data was analysed using SoftMax 5.1 software (Molecular Devices, USA) and expressed relative to the control oocyte lysate without the use of $3C_i$.

Hyaluronic acid (HA) measurement and evaluation of cumulus expansion

Groups of 25 COCs were cultured for 24 or 48 h in 1ml M199 medium with or without the 3C_i. At the end of the culture period, the COCs were washed four times in 500 µl PBS-PVA by gentle transferral, and the oocytes were mechanically removed by repeated pipetting during the last washing. To determine the HA retained in the expanded cumuli, the last washing was quantitatively transferred into an eppendorf tube and enzymatically digested by lyase from *Streptomyces hyalurolyticus* (2 IU/ml; Sigma-Aldrich, USA) at 39 °C overnight. Samples of retained HA in the COCs were stored at -20 °C until use.

At the same time, samples were prepared to quantify the amount of HA released by the COCs into the surrounding media. To do so, 900 μ l of used culture medium was incubated with 5 μ l of Alcalase 2.4L (2.4 IU/g; Sigma-Aldrich, USA) at 39 °C overnight and passed through Ultracel-30 Microcon microfilters (Merck, USA) by centrifugation for 30 min at 14,000 rpm, 4 °C. High molecular weight HA held on the filter membrane was digested by lyase under the above described conditions. Using enzymatic digestion, HA fragments were washed out from the filter membrane using 200 μ l PBS by centrifugation for 30 min at 14,000 rpm, 4 °C, thus being four times more concentrated compared with the original HA concentration in M199. Samples were stored at -20 °C until use.

Subsequently, the solutions were spectrophotometrically measured using Helios Gamma (Fisher Scientific, USA) at 216 nm against blank consisting of PBS-PVA or PBS with lyase, for retained HA and released HA respectively. Disposable polypropylene semi-micro cuvettes (7592 00, PlastiBRAND; Fisher Scientific, USA) were used. The quadratic calibration curve was based on five HA standards (0.006 - 0.1% sodium hyaluronate, S0780000; Sigma-Aldrich, USA) diluted and digested by protocol used for samples. Concentration of HA was expressed either as the retained or released HA and related to the control group.
Statistical analysis

The general linear models (GLM) procedure in SAS software (SAS Institute, USA) was used to analyse data from all experiments. Significant differences among groups were determined using Scheffe's test. P < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

1. Expression of hydrogen sulfide-releasing enzymes' genes in porcine oocytes

The aim of the experiment was to demonstrate mRNA presence of hydrogen sulfide-releasing enzymes, CBS, CTH and 3-MPST, using real time RT-qPCR. The mRNA measurement in growing (90, 100 and 110 μ m) and immature fully grown oocytes (GV) was performed to demonstrate real CBS, CTH and 3-MPST gene expression as a background for subsequent oocyte maturation (MI, MII) where the mRNA presence was also revealed. mRNA CBS was observed in growing and GV oocytes only, not in maturing (MI) and matured (MII) oocytes. Conversely in cumulus cells, mRNA CBS was found from 110 μ m through the period of the oocyte growing and maturing, with a significant increase around meiosis re-initiation (Fig. 1A). A constant level of CTH mRNA was demonstrated in oocytes, at the same time as a fall and rise again in cumulus cells during growth and meiosis re-initiation, respectively (Fig. 1B). Looking at 3-MPST mRNA, its oocyte level was observed only in 110 μ m and fully grown GV oocytes, while mRNA was constant in cumulus cells from 100 μ m through oocyte growth and maturation (Fig. 1C).

2. Observation of hydrogen sulfide-releasing enzymes in porcine oocytes

An objective of this experiment was to demonstrate CBS, CTH and 3-MPST proteins using immunocytochemistry and western blot analysis. For these analyses, immature GV oocytes, *in vitro* maturing MI and matured MII oocytes were used. The presence of CBS, CTH and 3-MPST was demonstrated in all oocyte stages by both immunocytochemistry and western blot (Fig. 2A,B). In addition, the presence of hydrogen sulfide-releasing enzymes was shown in surrounding cumulus cells (Fig. 2B). Presence of CBS and CSE in oocytes seems to be constant through oocyte maturation. On the other hand, 3-MPST shows decrease of protein amount. All hydrogen sulfide releasing enzymes in cumulus cells are without considerable changes (Fig. 2B).

3. Hydrogen sulfide-releasing enzymes' inhibition suppresses maturation of porcine oocytes throughout MPF/MAPK activity

The aim of these experiments was to evaluate the effect of the inhibition of hydrogen sulfide physiological production using enzymes' specific inhibitors in various combinations. Subsequently, the MPF and MAPK activities during $3C_i$ -suppressed oocyte maturation were analysed by the histone H1 and myelin basic protein (MBP) double assay.

No effect was observed of individual inhibitors expressed by MII achievement (Fig. 3A-C and Supplementary tables A1-A3), including for the double-combination of these inhibitors (Fig. 3D and Supplementary table A4). The triple-combination of hydrogen sulfide-releasing enzymes inhibitors significantly inhibited meiotic maturation in a dose-dependent manner (Fig. 4A and Supplementary table A5). For subsequent experiments, the most effective triple-combination (3C_i) of hydrogen sulfide-releasing enzymes inhibitors was used. Reversibly inhibited meiotic maturation and prolonged 72 h *in vitro* maturation showed deceleration, excluding a toxic effect of the used inhibitors. There were no statistically significant differences in oocyte maturation rate between the control oocytes and inhibited oocytes consequently treated with Na₂S.9H₂O, a hydrogen sulfide donor (Fig. 4B and Supplementary table A6), and no significant differences between control and 3C_i-inhibited oocytes after prolonged 72 h cultivation (Fig. 4C and Supplementary table A7).

The germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I achievement and metaphase II achievement coupled with first polar body were evaluated as markers of meiosis re-initiation, meiotic progress and the success of *in vitro* oocyte maturation under 3C_i treatment. There was observed significant slowdown of GVBD of 28.4 to 51.6% between 18–24 h cultivation (Fig. 5A), and further meiotic progress expressed by metaphase I (Fig. 5B) and metaphase II achievement (Fig. 5C) between 18–32 h of *in vitro* cultivation. See for more details Supplementary table A8.

The measurement of phosphorylated H1 and MBP, specific substrates of MPF and MAPK, respectively, show a decline in their kinase activity. The MPF activity significantly decreased after 24h oocyte maturation (100 vs. $63.0 \pm 6.7\%$ for control and $3C_i$, respectively), with further decrease in activity following after 36 h of oocyte cultivation (94.5 ± 11.7 vs. $60.1 \pm 4.8\%$ for control and $3C_i$, respectively). In addition, significant suppression of MAPK activity after 24h oocyte maturation occurred (100 vs. $63.8 \pm 6.4\%$ for control and $3C_i$, respectively). Data including representative autoradiographs is summarised in Fig. 5D and 5E.

4. Inhibition of hydrogen sulfide physiological production in porcine oocytes

The aim of the experiment was to reveal the physiological action of hydrogen sulfide-releasing enzymes, resulting in hydrogen sulfide production, in oocyte lysate. For proof of hydrogen sulfide-releasing enzymes' function, a triple-combination of their specific inhibitors (3C_i) in oocyte lysates and colorimetric measurement of hydrogen sulfide presence were performed.

Hydrogen sulfide production was not suppressed by $3C_i$ use in immature germinal vesicle (GV) oocytes. On the other hand, matured metaphase II (MII) oocytes were significantly inhibited in hydrogen sulfide production and hydrogen sulfide production decreased by 62.1%. Data is shown in Fig. 6.

5. Effect of inhibition of hydrogen sulfide production on cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes

Hyaluronic acid (HA) spectrophotometric measurement was used to evaluate cumulus expansion. COCs were cultured for 24 and 48 h *in vitro* and treated by $3C_i$ of hydrogen sulfide-releasing enzymes. No statistically significant differences were observed in the retained and released HA after 24 h *in vitro* oocyte maturation. A significant reduction in HA retained in COCs (100 vs. 66.5 ± 6.5% for control and $3C_i$, respectively) was observed after 48 h of cultivation. On the other hand, a significant increase in released HA occurred after 48 h of cultivation (100 vs. 138.7 ± 16.1% for control and $3C_i$, respectively). Data is shown in Fig. 7.

Discussion

In this study, we described endogenous hydrogen sulfide production in mammalian oocytes and its physiological role during meiotic maturation. We demonstrated the presence of mRNA and proteins of CBS, CTH and 3-MPST, hydrogen sulfide-releasing enzymes, in porcine oocytes. Based on our observation, we deduce endogenous hydrogen sulfide ability in the regulation of oocyte meiosis and cumulus expansion. A previous study [20] describing mRNA CBS in mouse oocyte and cumulus cells has denoted hydrogen sulfide as a gasotransmitter involved in oocyte maturation. As such, endogenous production of hydrogen sulfide in oocytes is considered to be a potential regulator of events in oocyte and surrounding cumulus cells, but this role has been only indicated [20,21]. However, our study is the first one to demonstrate the presence and role of CTH and 3-MPST in mammalian oocytes and cumulus expansion. In addition to observing all the hydrogen sulfide-releasing enzymes in porcine oocytes and cumulus cells, we are the first to demonstrate endogenous hydrogen sulfide production in oocytes and its necessity for *in vitro* oocyte maturation.

The mRNAs and proteins of hydrogen sulfide-releasing enzymes detected in our experiments, suggest a specific role for these enzymes during oocyte growth and maturation. While mRNA CTH was present at an almost constant level for the whole of the growth and maturation phases, mRNA CBS presence in the oocyte is limited to the growing phase, mRNA in cumulus cells does not change during growth and increases during oocyte maturation. mRNA 3-MPST appears briefly in the oocyte shortly before meiosis re-initiation, suggesting 3-MPST is required for meiotic competence. Regardless of mRNA CBS and 3-MPST absence, both proteins are present in the oocyte during *in vitro* meiotic maturation. In addition to CBS and CTH, we detected the presence of 3-MPST in oocytes.

Although separate usage of hydrogen sulfide-releasing enzymes' inhibitors and their doublecombinations did not have a significant effect on oocyte maturation, the effective triplecombination $(3C_i)$ of all inhibitors suppressed meiotic maturation and affected cumulus expansion. We can assume that individual enzymes are capable of substituting for each other, and as such only the concurrent inhibition of all of them has a significant impact. A similar substitution of hydrogen sulfide-releasing enzymes is also presumed in somatic cells [28]. The observation of $3C_i$ -suppressed GVBD and oocyte maturation is in agreement with our previous study describing maturation acceleration using Na₂S, an exogenous hydrogen sulfide donor [13]. Regarding the specific action of inhibitors, the Na₂S reverse effect on 3C_i-suppressed oocyte maturation was tested. Moreover, the effect of inhibitors on physiological hydrogen sulfide production was proven by the significant fall in hydrogen sulfide content in the 3C_i-treated oocyte lysate. Interestingly, a 3Ci effect was detected in matured MII, but not GV oocytes. We can speculate that immature no-cultured GV oocytes have a sufficient amount of hydrogen sulfide itself and enzymatic production is not necessary to keep its level up. Early maturing oocytes are able to utilise this hydrogen sulfide stock, and thus, the matured oocyte fully depends on the action of hydrogen sulfide-releasing enzymes in a re-synthesised sufficient amount. Positive feedback loop due to activity stimulation of CBS and CSE through S-Sulfhydration, hydrogen sulfide-mediated post-translational protein modification (Mustafa et al. 2009, ref. 29,30), is possible way of promt hydrogen sulfide releasing in early stage of oocyte maturation. Until this, hydrogen sulfide-releasing enzymes in immature oocyte can be present in sufficient amount but with low physiological action. This assumption is in the accordance with our observed $3C_i$ -suppressed GVBD during 18 - 32 h of *in vitro* cultivation as well as deceleration of following meiotic stages, where the presence of active hydrogen sulfidereleasing enzymes is already necessary and their inhibition is effective.

We discovered that meiotic maturation of $3C_i$ -treated oocytes is not irreversibly inhibited but only suppressed. This is suggested by a further 24 h *in vitro* cultivation following 48 h maturation. This meiotic suppression was caused by slower MPF and MAPK activation at the beginning of oocyte cultivation. If the activation peaks of MPF and MAPK were damped, one can also note that they were not delayed, as might have been expected by observing the delay in meiotic progression. Conversely, we have described an accelerating effect of the hydrogen sulfide donor on MPF and MAPK activites [13].

The molecular mechanism of hydrogen sulfide's effect on MPF and MAPK regulation remains unknown, however, S-Sulfhydration changing the activity of various proteins [29,30] is possible explanation. Of these, ion channels, involved in the regulation of mammalian oocyte maturation [summarised in 31], are post-translationally modified by hydrogen sulfide, as well as various enzymes with catalytic ability [29,32,33]. Therefore, we can assume regulation of MPF and MAPK activities and/or their up-stream kinases or phosphatases. S-Sulfhydration and activation of MEK1, a direct MAPK regulator, is known to occur in somatic cells [34] and it may be presumed in oocytes too. Another possible explanation is cAMP/PKA [35] and PI3K/Akt [36] regulation by hydrogen sulfide, signal pathways essential for oocyte maturation [37,38]. Phosphatases activities can also be targeted by hydrogene sulfide [39,40]. Above mentioned targets, S-Sulfhydration is possible way how to modulate production of other gasotransmitters, i.e. nitric oxide and carbon monoxide. S-Sulfhydration of endothelial nitric oxide synthase and increasing of its activity has been descibed (Altaany et al. 2014). In addition to S-Sulfhydration, hydrogen sulfide acts *via* interactions with other gasotransmiters in somatic cells (Heine et al. 2015, Yuan et al. 2015). Altough gasotransmiters' cross-talk are not understood in oocytes, we can assume nitric oxide down-regulation and therefore indirect hydrogen sulfide influence on oocyte maturation key signal pathways, such as already mentioned cAMP/PKA or cGMP/PKG, known target of nitric oxide (Petr et al. 2006, Zhang et al. 2007).

Above *in vitro* oocyte maturation, the role of gasotransmitters in hypothalamic-pituitarygonadal axis regulation *in vivo* has been described (Lamar et al. 1996, Mancuso et al. 2010, Prevot et al. 1999) and hydrogen sulfide-directed functions of pituitary cells are known (Sidtikova et al. 2010). Therefore, overall effects of hydrogen sulfide resulting to regulation of gonadotropin releasing hormone secretion and/or modulation of gonadal activity in hormone secretion are expectable. Obviously, observed hydrogen sulfide effect on *in vitro* maturing oocytes is only part of wide hydrogen sulfide abilities including gasotransmitter interactions.

Our observation of mRNA and proteins of CBS, CTH and 3-MPST in cumulus cells indicates that hydrogen sulfide has a regulating effect in cumuli of cumulus-oocyte complexes. This presumption has been improved by the inhibition of hydrogen sulfide production and its effect on cumulus expansion. In our previous study [13], we have demonstrated the inhibitory effect of an exogenous hydrogen sulfide donor on HA production in the extracellular matrix of expanded cumuli. In this study, the inhibition of hydrogen sulfide-releasing enzymes does not influence HA production after 24 h in vitro cultivation of COCs. After 48 h cultivation, decreasing HA retention in COCs and a boost in HA being released into the culture medium occurred. The suppression in HA production can be associated with observed oocyte maturation failure. In addition to mentioned impact of cumulus expansion for oocyte maturation, the protective effect of HA on cell viability [41] and its lack could be responsible for a decrease in oocyte quality through pro-apoptotic signal pathways present in oocytes [42]. This study gives the first description of all the hydrogen sulfide-releasing enzymes in mammalian oocytes and confirmation of their physiological action consisting of hydrogen sulfide release. The requirement of hydrogen sulfide in MPF and MAPK-induced oocyte maturation at particular times has been observed. Moreover, HA production by expanded cumuli seems to be regulated by endogenously produced hydrogen sulfide. However, further experiments testing the exact mechanism of hydrogen sulfide action are required to fully understand gasotransmitter signal pathways in mammalian oocytes.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by the National Agency for Agricultural Research (NAZV QJ1510138), the Czech Ministry of Agriculture (MZeRO 0714), the Czech Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Institutional Developing Project – the Long-term Ph.D. Intership Foundation) and the Czech University of Life Sciences in Prague (CIGA 20132035). We would like to thank the Institute of Experimental Botany of the Academy of Sciences of the Czech Republic for their technical support and Mr. Brian Kavalir for his editorial assistance with this manuscript.

Figures



Fig. 1. Amount of mRNA hydrogen sulfide-releasing enzymes in oocytes. A,B,C: The mRNA of CBS, CTH and 3-MPST, respectively, were analysed by real time RT-qPCR in oocytes and their cumulus cells during oocyte growth (with 90 μ m, 100 μ m and 110 μ m diameter), immature GV, maturing MI and matured MII oocytes. The relative mRNA levels were normalised to GAPDH and related to GV oocytes and their cumulus cells by 2- $\Delta\Delta$ CT formula. Each stage includes 50 oocytes and their cumulus cells in six independent experiments. The bars show the means ± SEMs of relative mRNA amount. Bars with different letters and numbers are significantly different for oocytes and their cumulus cells, respectively (P < 0.05).



Fig. 2. Representative pictures of oocyte CBS, CTH and 3-MPST. The enzymes were immunocytochemically localised in immature GV, maturing MI and matured MII oocytes. B: The verification of enzyme presence by western blot analysis in oocytes and their cumulus cells. The immunocytochemical observation each enzyme was performed on 15 oocytes for each meiotic stage. Samples of 100 oocytes and their cumulus cells of each meiotic stage were used for western blot analysis. Scale $bar = 50 \mu m$.







Fig. 4. Effect of restriction of hydrogen sulfide production on oocyte maturation. À: Proportion of matured oocytes and first polar body extrusion after treatment by triple-combination of inhibitors during 48 h *in vitro* maturation. Triple-combination: 1 - 0.25 mM oxamic acid, 0.25 mM DL-propargylglycine and 0.5 mM α-ketoglutaric acid; 2 - 0.5 mM oxamic acid, 0.5 mM DL-propargylglycine and 1 mM α-ketoglutaric acid; 3 - 1 mM oxamic acid, 1 mM DL-propargylglycine and 2.5 mM α-ketoglutaric acid; 4 - 2 mM oxamic acid, 2 mM DL-propargylglycine and 5 mM α-ketoglutaric acid (3C_i; considered as effective concentration in subsequent experiments). B: Reverse effect of hydrogen sulfide donor (300 μM Na₂S.9H₂O) on 3C_i-suppressed oocyte maturation (3C_i+Na₂S). C: Proportion of matured oocytes after prolonged 72 h cultivation under 3C_i treatment. Each experimental (A,B,C) group includes 120 in three independent experiments. Bars show the means of percentage ratio ± SEMs. Bars with different letters are significantly different (P < 0.05).



Fig. 5. Inhibition of hydrogen sulfide production by $3C_i$ and its effect on GVBD and the progress of meiotic maturation. A,B,C: Proportion of GVBD, MI achievement and meiosis I to II transition, respectively, during 32 h oocyte maturation were elucidated. Each experimental group includes 120 oocytes in all of the time points in three independent experiments. Points show the means of percentage ratio \pm SEMs. Points with asterisk show significant difference between control and $3C_i$ groups (P < 0.05). D,E: Inhibition of hydrogen sulfide production by $3C_i$ and its effect on MPF and MAPK activities oocyte maturation. Signal quantifications and representative autoradiographs of phosphorylated histone H1 and MBP reflecting MPF and MAPK activity, respectively, during 32 h oocyte maturation. Each sample includes 15 oocytes in six independent experiments. Points show the means of signal intensity related to a control matured 24 h \pm SEMs. Points with asterisk show significant difference between control and $3C_i$ groups (P < 0.05).



Fig. 6. Real hydrogen sulfide production in GV and matured MII oocytes verified with $3C_i$ treatment. The hydrogen sulfide production in $3C_i$ -treated oocytes was related to GV and MII oocytes of control untreated groups following the calculation by standard curve. Each experimental group includes 150 oocytes in three independent experiments. Bars show the means of relative amount of hydrogen sulfide \pm SEMs. Bar with asterisk indicates significant difference between control and $3C_i$ groups for each maturation stage (P < 0.05).



Fig. 7. Effect of 3C_i-inhibited production of hydrogen sulfide on HA synthesis during cumulus expansion. A,B: HA retained in COCs and HA released into the culture medium were measured after 24 and 48 h of cultivation, respectively, as markers of cumulus expansion. The HA retained and HA released in 3C_i-treated COCs was related to MI and MII oocytes of control untreated groups following the calculation by standard curve. Each sample includes 25 oocytes in six independent experiments. Bars show the means of relative amount of HA \pm SEMs. Bar with asterisk indicates significant difference between control control and 3C_i (P < 0.05).

Table 1 Specific primers for mRNA of hydrogen sulfide enzymes detection

Gene	Forward primers 5'-3'	Reverse primers 5'-3'	TaqMan probe 5'-3'	Gene bank	Annealing	Product size (bp)
				accession	temperature	
				number	(°C)	
CBS	CAGCGCTGCGTGGTGAT	TCACTCAGGAACTTGGACATGTAGTT	CTGCCAGACTCTGTG	XM_0067	60	62
				24057		
CTH	GAGCAGTGGGCCTCCAAAG	TTGTTTGAACGTGGTGGACAGT	TGTAGTGCCCCCCATC	NM_001	60	60
				044585		
3-MPST	GCCCGCCGAGTTCCA	TGATGTCCTCGTAGGTCTTGACA	CTGTGCTGGACCCC	XM_0019	60	62
				26451		

Table A1. Effect of oxamic acid, a specific inhibitor of CBS, on oocyte maturation after 48 h cultivation.

	Stage of	Stage of meiotic maturation					
		n					
	MI	MI AI/TI MII					
control	1.9±0.8ª	1.9±0.8 ^b	96.3±0.8ª	120			
0.5 mM	3.3±2.2ª	0.8±0.8 ^b	95.8±1.7 ^{a,b}	120			
1.0 mM	4.2±2.2ª	1.7±0.8 ^b	94.2±1.7 ^{a,b}	120			
2.0 mM	0.8±0.8 ^a	120					
4.0 mM	7.5±2.5ª	5.0±1.4ª	87.5±2.9⁵	120			

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

	Stage of	11					
	(n					
	MI	MI AI/TI MII					
control	1.7±0.8ª	0.8±0.8 ^a	97.5±1.4ª	120			
0.25 mM	0.8±0.8 ^a	0.8±0.8 ^a	98.3±0.8ª	120			
0.5 mM	0.8±0.8ª	3.3±0.8ª	95.8±0.8ª	120			
1.0 mM	4.2±1.7ª	0.8±0.8ª	95.0±1.4ª	120			
2.0 mM	1.7±1.7ª	2.5±1.4ª	95.8±0.8ª	120			

Table A2. Effect of DL-propargylglycine, a specific inhibitor of CTH, on oocyte maturation after 48 h cultivation.

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase 12 I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

	Stage of	f meiotic ma	turation	18		
	((% ± S.E.M.)				
	MI	AI/TI	MII			
control	1.7±1.7ª	0.8±0.8 ^a	97.5±1.4ª	120		
1.0 mM	0.0±0.0 ^a	1.7±1.7ª	98.3±1.7ª	120		
2.0 mM	2.5±1.4ª	1.7±0.8ª	95.8±0.8ª	120		
5.0 mM	2.5±2.5ª	0.8±0.8ª	96.7±2.2ª	120		
10.0 mM	2.5±0.0 ^a	2.5±1.4ª	95.0±1.4ª	120		

Table A3. Effect of α -ketoglutaric acid, a specific inhibitor of 3-MPST, on oocyte maturation after 48 h cultivation.

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

Table A4. Effect of two-combinations of H2S releasing enzymes' inhibitors on oocyte maturation after 48 h cultivation.

	Stage of	Stage of meiotic maturation					
	((% ± S.E.M.)					
	MI	MI AI/TI MII					
control	0.8±0.8ª	0.8±0.8 ^{a,b}	98.3±0.8ª	120			
pag-oxam	0.0±0.0 ^a	7.5±2.5ª	92.5±2.5ª	120			
keto-oxam	4.2±0.8 ^a	0.0±0.0 ^b	95.8±0.8ª	120			
keto-pag	2.5±1.4ª	2.5±1.4 ^{a,b}	95.0±1.4ª	120			

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. Two-combinations: pag-oxam - 2 mM DL-propargylglycine and 2 mM oxamic acid; keto-oxam - 5 mM α -ketoglutaric acid and 2 mM oxamic acid; keto-pag - 5 mM α -ketoglutaric acid and 2 mM oxamic acid; keto-pag - 5 mM α -ketoglutaric acid and 2 mM DL-propargylglycine. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

Table A5. Effect of three-combination of H2S releasing enzymes' inhibitors in various concentration on oocyte maturation after 48 h cultivation.

	Stage of	35					
	((% ± S.E.M.)					
	MI	AI/TI	ΜII				
control	0.5±0.6 ^{b,c}	4.8±1.1°	94.7±0.8ª	120			
1	4.1±1.6 ^b	20.7±1.6ª	75.2±2.7⁵	120			
2	17.5±1.4ª	6.7±0.8 ^c	75.8±1.7°	120			
3	15.8±0.8ª	16.7±0.8 ^{a,b}	67.5±1.4 ^{b,c}	120			
4	20.8±3.0 ^a	14.2±0.8 ^b	65.0±2.9°	120			

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. Three-combinations: 1 - 0.25 mM oxamic acid, 37 0.25 mM DL-propargylglycine and 0.5 mM α -ketoglutaric acid; 2 - 0.5 mM oxamic acid, 0.5 mM DL-propargylglycine and 1 mM α -ketoglutaric acid; 3 - 1 mM oxamic acid, 1 mM DL-propargylglycine and 2.5 mM α -ketoglutaric acid; 4 - 2 mM 2 mM oxamic acid, DL-propargylglycine and 5 mM α -ketoglutaric acid. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

Table A6. Reverse effect of Na2S, a hydrogen sulfide donor, on oocyte maturation suppressed by effective three-combination (3Ci) of H2S releasing enzymes' inhibitors after 48 h cultivation.

	Stage of	Stage of meiotic maturation						
	((% ± S.E.M.)						
	MI	MI AI/TI MII						
control	4.2±0.8⁵	120						
3C _i	19.2±0.8ª	16.7±0.8ª	64.2±0.8°	120				
$3C_1 + Na_2S$	2.5±1.4⁵	5.8±0.8 ^b	91.7±2.2⁵	120				
Na ₂ S	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	100.0±0.0 ^a	120				

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. $3C_i - 2 \text{ mM } 2 \text{ mM}$ oxamic acid, DL-propargylglycine and 5 mM α -ketoglutaric acid; $Na_2S - Na_2S.9H_2O$, the hydrogen sulfide donor. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

Table A7. Effect of 72 h prolonged cultivation on oocyte maturation supressed by effective three-combination (3Ci) of H2S releasing enzymes'.

	Stage of	56		
	(n		
	MI	AI/TI	MII	
control	2.5±0.0ª	3.3±0.8 ^b	94.2±0.8ª	120
3C _i	0.8±0.8 ^a	6.7±0.8ª	92.5±0.0 ^a	120

MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. $3C_i - 2 \text{ mM } 2 \text{ mM}$ oxamic acid, DL-propargylglycine and $5 \text{ mM} \alpha$ -ketoglutaric acid. Statistically significant differences among experimental groups in the same nuclear stage (in column) are indicated by different letters (P<0.05).

Stage of meiotic maturation ($\% \pm S.E.M.$)						n	
		GV	LD	MI	AI/TI	ΜП	
18 h	control	65.0±2.9	10.8±1.7	24.2±1.7	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	96.7±0.8*	3.3±0.8*	0.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
20 h	control	31.7±3.3	24.2±2.2	44.2±2.2	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	83.3±1.7*	10.8±2.2*	5.8±0.8*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
22 h	control	20.8±1.7	20.0±1.4	59.2±3.0	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	49.2±3.0*	23.3±3.6	27.5±2.9*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
24 h	control	0.0±0.0	3.3±1.7	96.7±1.7	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	33.3±1.7*	36.7±0.8*	30.0±1.4*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
26 h	control	0.0±0.0	0.0±0.0	70.0±1.4	30.0±1.4	0.0±0.0	120
	3C _i	27.5±2.9*	30.8±4.2*	41.7±2.2*	0.0±0.0*	0.0±0.0	120
28 h	control	0.0±0.0	0.0±0.0	70.0±2.9	30.0±2.9	0.0±0.0	120

Table A8. Effect of effective three-combination (3Ci) of H2S releasing enzymes' inhibitors on oocyte maturation course.

	3C _i	25.8±1.7*	20.0±1.4*	45.0±1.4*	9.2±1.7*	0.0±0.0	120
30 h	control	0.0±0.0	0.0±0.0	42.5±2.9	53.3±0.8	4.2±2.2	120
	3Ci	11.0±2.3*	5.0±1.4*	68.0±2.4*	16.0±2.2*	0.0±0.0	120
32 h	control	0.0±0.0	0.0±0.0	40.0±1.4	49.2±0.8	10.8±2.2	120
	3C _i	10.0±1.4*	5.0±1.4*	51.7±0.8*	28.3±2.2*	5.0±1.4	120

GV: germinal vesicle oocytes; LD: late diakinesis ooccytes; MI: metaphase I oocytes; AI/TI: anaphase I to telophase I transition oocytes; MII: metaphase II oocytes. $3C_i - 2 \text{ mM } 2 \text{ mM}$ oxamic acid, DL-propargylglycine and 5 mM α -ketoglutaric acid. Statistically significant difference between control and $3C_i$ in the same time point and the nuclear stage is indicated by asterisk.

References

[1] P.M. Wassarman, The mammalian ovum, in: E. Knobil, J Neill (Eds.), The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York, 1988, pp. 69–102.

[2] R. Yanagimachi, Mammalian fertilization, in: E. Knobil, J Neill (Eds.), The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York, 1988, pp. 230–278.

[3] N. Dekel, Y. Hillensjo, P.F. Kraicer, Maturation effects of gonadotropins on the cumulusoocyte complex of the rat, Biol. Reprod. 20 (1979) 191–197.

[4] J.J. Eppig, FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles, Nature, 281 (1979) 483–484.

[5] T. Nakayama, M. Inoue, E. Sato, Effect of oocytectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro*, Biol. Reprod. 55 (1996) 1299–1304.

[6] A. Salustri, A. Camaioni, E. Tirone, C. D'Alessandris, Hyaluronic acid and proteoglycan accumulation in the cumulus oophorus matrix, Ital. J. Anat. Embryol. 100 Suppl. 1 (1995) 479-84.

[7] N. Dekel, T.S. Lawrence, N.B. Gilula, W. Beers, Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH, Dev. Biol. 86 (1981) 356–362.

[8] J. Tornell, M. Brannstorm, T. Hillensjo, Different effects of cyclic-nucleotide derivates upon the rat oocyte–cumulus complex *in vitro*, Acta Physiol. Scand. 122 (1984) 507–513.

[9] M. Yokoo, T. Shimizu, N. Kimura, W.A. Tunjung, H. Matsumoto, H. Abe, H. Sasada, H. Rodriguez-Martinez, E. Sato, Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation, J. Reprod. Dev. 53 (2007) 263-70.

[10] M. Yokoo, N. Kimura, E. Sato E, Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs, J. Reprod. Dev. 56 (2010) 15-9.

[11] M. Kubelka, J. Motlik, R.M. Schultz, A. Pavlok, Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. Biol. Reprod. 62 (2000) 292-302. [12] Q.Y. Sun, Q. Lu, H. Breitbart, D.Y. Chen, cAMP inhibits mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and resumption of meiosis, but exerts no effects after spontaneous germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes, Reprod. Fertil. Dev. 11 (1999) 81-86.

[13] J. Nevoral, A. Gelaude, J.F. Bodart, V. Kucerova-Chrpova, M. Sedmikova, T. Krejcova,
T. Kolbabova, M. Dvorakova, A. Vyskocilova, I. Weingartova, L. Krivohlavkova, T. Zalmanova, F. Jilek, Dual effect of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes, PLOS ONE 9 (2014) e99613.

[14] T. Krejcova, M. Smelcova, J. Petr, J.F. Bodart, M. Sedmikova, J. Nevoral, M. Dvorakova, A. Vyskocilova, I. Weingartova, V. Kucerova-Chrpova, E. Chmelikova, L. Tumova, F. Jilek, Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes, PLOS ONE 10 (2015) e0116964.

[15] J. Nevoral, M. Orsak, P. Klein, J. Petr, M. Dvorakova, I. Weingartova, A. Vyskocilova, K. Zamostna, T. Krejcova, F. Jilek, Cumulus cell expansion, a role in oocyte biology and its measurement: a review, Sci. Agri. Boh. 45 (2014) 13-26.

[16] H. Kimura, The physiological role of hydrogen sulfide and beyond, Nitric Oxide 41 (2014)4-10.

[17] Q. Li, J.R. Lancaster Jr., Chemical foundations of hydrogen sulfide biology, Nitric Oxide 35 (2013) 21-34.

[18] R. Wang, Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulphide, Curr. Opin.Nephrol. Hypertens. 20 (2011) 107-112.

[19] N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasa-Wara, T. Togawa, K. Ishii, H. Kimura, 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain, Antioxid. Redox. Signal. 11 (2009) 703-714.

[20] R. Liang, W.D. Yu, J.B. Du, L.J. Yang, M. Shang, J.Z. Guo, Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development, Chin. Med. J. 119 (2006) 1877-1883.

[21] R. Liang, W.D. Yu, J.B. Du, L.J. Yang, J.J. Yang, X. Jian, M. Shang, J.Z. Guo, Cystathionine β synthase participates in murine oocytes maturatione mediated by homocysteine, Reprod. Toxicol. 24 (2007) 89-96.

[22] J. Motlik, J. Fulka, Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*, J.Exp. Zool. 198 (1976) 155-162.

[23] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, Methods 25 (2001) 402-408.

[24] E.W. Kuijk, L. du Puy, H.T. van Tol, H.P. Haagsman, B. Colenbrander, B.A. Roelen, Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos, BMC Dev. Biol. 7 (2007) 58.

[25] Y.J. Yi, M. Sutovsky, W.H. Song, P. Sutovsky, Protein deubiquitination during oocyte maturation influences sperm function during fertilisation, antipolyspermy defense and embryo development, Reprod. Fertil. Dev. (2014) doi: 10.1071/RD14012.

[26] L. Tůmová, J. Petr, T. Žalmanová, E. Chmelíková, T. Kott, H. Tichovská, V. Kučerová-Chrpová, K. Hošková, F. Jílek, Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation, Anim. Reprod. Sci. 141 (2013) 154-163.

[27] K. Abe, H. Kimura, The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator, J. Neurosci. 16 (1996) 1066–1071.

[28] R. Sanokawa-Akakura, E.A. Ostrakhovitch, S. Akakura, S. Goodwin, S. Tabibzadeh, A H₂S-Nampt dependent energetic circuit is critical to survival and cytoprotection from damage in cancer cells, PLOS ONE 9 (2014) e108537.

[29] A.K. Mustafa, M.M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S.K. Gazi, R.K. Barrow, G. Yang,R. Wang, S.H. Snyder, H₂S signals through protein S-Sulfhydration, Sci. Signal. 2 (2009) ra72.

[30] N. Sen, B.D. Paul, M.M. Gadalla, A.K. Mustafa, T. Sen, R. Xu, S. Kim, S.H. Snyder, Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions, Mol. Cell 45 (2012) 13-24.

[31] E. Tosti, R. Boni, A. Gallo, F. Silvestre, Ion currents modulating oocyte maturation in animals, Syst. Biol. Reprod. Med. 59 (2013) 61-68.

[32] B.D. Paul, S.H. Snyder, H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond, Nat.Rev. Mol. Cell. Biol. 13 (2012) 499-507.

[33] Z. Altaany, Y. Ju, G. Yang, R. Wang, The coordination of S-Sulfhydration, S-Nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulphide, Sci. Signal. 7 (2014) ra87.

[34] K. Zhao, Y. Ju, S. Li, Z. Altaany, R. Wang, G. Yang, S-Sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair, EMBO Rep. 15 (2014) 792-800.

[35] Y.F. Njie-Mbye, M. Kulkarni, C.A. Opere, S.E. Ohia, Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formatrion in rat retinal pigment epithelial cells, Exp. Eye Res. 98 (2012) 16-22.

[36] Y. Hu, X. Chen, T.T. Pan, K.L. Neo, S.W. Lee, E.S. Khin, P.K. Moore, J.S. Bian, Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways, Pflugers Arch. 455 (2008) 607–616.

[37] M. Kovo, M. Kandli-Cohen, M. Ben-Haim, D. Galiani, D.W. Carr, N. Dekel, An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes, Reproduction 132 (2006) 33-43.

[38] J. Kalous, M. Kubelka, P. Solc, A. Susor, J. Motlík J, AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes, Reproduction 138 (2009) 645-654.

[39] G. Buhrman, B. Parker, J. Sohn, J. Rudolph, C. Mattos, Structural mechanism of oxidative regulation of the phosphatase Cdc25B via an intramolecular disulfide bond, Biochemistry 44 (2005) 5307-5316.

[40] E. Viry, A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diederich, D. Bagrel, Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases, Int. J. Oncol. 38 (2011) 1103-1111.

[41] W.A. Tunjung, M. Yokoo, Y. Hoshino, Y. Miyake, A. Kadowaki, E. Sato, Effect of hyaluronan to inhibit caspase activation in porcine granulosa, Biochem. Biophys. Res. Commun. 382 (2009) 160-164.

[42] M. Sedmíková, J. Petr, A. Dörflerová, J. Nevoral, B. Novotná, T. Krejčová, E. Chmelíková,
L. Tůmová, Inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK) suppresses porcine oocyte ageing *in vitro*, Czech J. Anim. Sci. 58 (2013) 535-545.

[43] N. Kimura, Y. Konno, K. Miyoshi, H. Matsumoto, E. Sato, Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation, Biol. Reprod. 66 (2002) 707-717.

[44] M. Yokoo, Y. Miyahayashi, T. Naganuma, N. Kimura, H. Sasada, Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expression in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation, Biol. Reprod. 67 (2002) 1165-1171.

RESULTATS MAJEURS

1. Effets du NO et du H₂S sur la méiose de l'ovocyte de xénope

1.1 Effets d'un donneur de NO sur les ovocytes de xénope.

Nous nous sommes intéressés plus précisément aux effets d'un donneur de NO, le SNAP, sur les étapes précoces de la méiose (entre les blocages en prophase I et en métaphase II), de l'ovocyte de xénope. L'ensemble de cette étude visé l'exploration des mécanismes impliquant le NO dans la méiose des vertébrés, chez le xénope. Dans un premier il a pu être observé que le SNAP utilisé à différentes concentrations (500μ M, 1 mM et 2,5 mM) entrainé un retard dépendant de la dose voir, à faire concentration, une inhibition de la reprise de méiose des ovocytes de xénope. À l'issu des expérimentations menées, deux résultats majeurs peuvent être mis en avant : le SNAP perturbe la mise en place de la tâche de maturation en entrainant une baisse du pH du milieu et influe sur la mise en place du fuseau méiotique par la production de NO (Figure 51).



Figure 51 : Récapitulatifs des effets du SNAP sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope. Le SNAP entraine une libération de NO ainsi qu'une baisse de pH dans le milieu de culture des ovocytes. La baisse de pH serait responsable de l'inhibition de la reprise de méiose induite par la progestérone. Le NO serait capable d'entrainer une mauvaise mise en place du fuseau, en influençant les protéines du cytosquelette, mais aussi les MAPKs.

L'utilisation de NaOH, pour restaurer le pH initial du milieu, n'influence pas la morphogenèse du fuseau, mais permet l'apparition des tâches de maturation. En revanche, l'utilisation de NAP, équivalent biochimique du SNAP ne libérant pas de NO, permet la mise en place des fuseaux sans influencer l'absence d'apparition de tâche de maturation.

De plus, l'utilisation de SNAP sur les ovocytes de xénope altère les voies biochimiques impliquées dans la reprise de méiose induite par la progestérone comme les voies MAPK et l'activation du MPF. Cependant la majorité des ovocytes présentent un profil d'ovocyte ayant effectué une reprise de méiose.

1.2. Effets du donneur de H₂S sur les ovocytes de xénope.

Le NaHS, un donneur de H_2S , a été utilisé à différentes concentrations (100 μ M, 500 μ M, 1 mM et 5 mM) sur les ovocytes de xénope afin de déterminer ses effets sur la reprise de méiose. Nous avons mis en évidence un effet inhibiteur du NaHS sur la reprise de méiose induite par la progestérone ou par la micro-injection de cytoplasme d'ovocytes matures. Nous avons pu démontrer que cette inhibition cible notamment la synthèse protéique et la boucle d'auto-amplification du MPF (Figure 52). En effet, lorsqu'un ARNm Myt-Myc est micro-injecté dans l'ovocyte, celui-ci est capable de le prendre en charge afin de produire la protéine correspondante. La traduction est inhibée en présence de NaHS, de façon dépendante de la dose, comme le montre la baisse de la quantité de protéine produite observée en en western blot.



Figure 52 : Récapitulatif des effets du H₂S sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope. Le H₂S entraine une inhibition de la reprise de méiose en inhibant la synthèse protéique et la phosphatase Cdc25c.

Puisque la maturation induite par la micro-injection de cytoplasme d'ovocyte mature est inhibée par les fortes concentrations de NaHS, nous avons pu conclure que le H_2S altérait les mécanismes de la boucle d'auto-amplification de MPF. Celle-ci comprend deux composants majeurs : le MPF et la phosphatase Cdc25c. Nous avons démontré que le H_2S n'entrainait pas de dissociation du complexe MPF, ni une inactivation de l'activité kinase du MPF. Les effets du H₂S ne sont en revanche pas liés à l'activité PKA. La micro-injection de H-89, un inhibiteur de l'activité PKA, dans l'ovocyte n'entraine aucune réversion des effets du NaHS sur la reprise de méiose. Enfin nous avons démontré que les effets du NaHS sur la reprise de méiose étaient en partie ROS dépendant en utilisant la SOD et la Catalase, deux enzymes anti-oxydantes. De même, le NaHS ne perturbe ni l'activité, ni la mise en place de la cascade des MAPK.

2. Effet de l'hydrogène sulfuré sur la reprise de méiose et l'expansion du cumulus des ovocytes de porc

2.1. Effets du Na₂S, un donneur de H_2S , sur la reprise de méiose des ovocytes de porc et l'expansion du cumulus

L'étude menée par nos collaborateurs de l'université de la vie et des sciences de Prague a démontré que l'utilisation d'un donneur de H₂S à des concentrations allant de 150 μ M à 300 μ M entrainait une augmentation du nombre d'ovocytes de porc présentant une GVBD et une accélération de la transition métaphase I à métaphase II et cela de façon dépendante de la dose. À l'inverse le Na₂S entraine une diminution de l'expansion du cumulus et de la quantité de HA produit. Cet effet est dépendant de l'ovocyte et non uniquement des cellules du cumulus. Le Na₂S utilisé à une concentration de 300 μ M accélère l'activation de la voie MAPK et MPF entrainant une différence significative avec la condition contrôle à 20h et 22h de maturation respectivement.

2.2 Effets des inhibiteurs du métabolisme du H_2S sur la reprise de méiose et l'expansion du cumulus

Les ARNms des enzymes du métabolisme du H₂S, CBS, CSE et 3-MPST, sont détectables à des niveaux variables au cours cours de la maturation ovocytaires de l'ovocyte de xénope. Leur inhibition conjointe entraine un retard de maturation des ovocytes de xénope ainsi qu'une diminution du nombre d'ovocytes présentant une GVBD. Une libération de HA dans le milieu est aussi observable en présence de ces inhibiteurs.

3. Effets du H₂S sur la fécondation et le développement précoce.

Les effets du H_2S sur la fécondation et le développement précoce des ovocytes de porc et de xénope sont à nouveau contradictoires. Sur l'ovocyte de porc il a pu être observé une augmentation du taux de fécondation des ovocytes contre une diminution indépendante de la dose dans le cas des ovocytes de xénope. De même, alors que le NaHS entraine des retards dans le développement précoce des ovocytes de xénope, aucun effet du Na₂S n'est observé sur les ovocytes de porc.

DISCUSSIONS, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

1. Altération du développement embryonnaire

1.1. Effets des gazotransmetteurs sur le développement embryonnaire

1.1.1. Fécondation et activation parthénogénétique

Il était déjà connu que le monoxyde d'azote est capable d'entrainer une activation parthénogénétique des ovocytes de différents modèles animaux (Petr et al., 2006, 2000; Jablonka-Shariff and Olson, 1998). L'activation de ces ovocytes de porc par le SNAP est dépendante du GMPc et de la PKG (Petr et al., 2005). Il était légitime d'étudier les effets d'un autre gazotransmetteur, l'hydrogène sulfuré, sur le maintien des ovocytes de xénope en MII. Des études préliminaires, effectuées par un stagiaire en master 1 (Eudes Brian) du laboratoire, ont suggéré que le NaHS serait capable d'entrainer une activation des ovocytes de xénope. Pour cela des ovocytes matures ont été mis en contact d'un ionophore calcique. Le NaHS à forte concentration (5 mM) permet d'accélérer et d'augmenter le pourcentage d'ovocytes activés. Cependant le NaHS seul ne semble pas être capable d'entrainer une activation des ovocytes de xénope. Étudier plus précisément les mécanismes derrière cette augmentation du nombre d'ovocytes activés semblerait constituer un sujet d'étude intéressant (analyses cytologiques, exocytose des granules corticaux, analyses des voies de signalisation : dégradation de la cycline B, inactivation de la voie MAPK).

Nous avons démontré qu'il existait une diminution du taux de fécondation des ovocytes de xénope en présence de NaHS à différentes concentrations sans effet dose. Cependant lors de ces expériences les deux gamètes ont été mis en contact avec le NaHS ne permettant pas de déterminer le ou les gamète(s) sensible(s). Il paraitrait donc intéressant de réaliser de nouvelles fécondations en exposant un seul gamète (mâle ou femelle) au NaHS.

1.1.2. Organogenèse

Une seule expérience a permis l'obtention et l'étude des phénotypes de têtard de 6 jours dans la condition 100μ M de NaHS par une coloration au bleu alcian. Les conditions 500μ M et 1mM de NaHS ne permettent pas d'obtenir des têtards à ce stade, ceux-ci ne dépassant jamais le stade de l'embryogenèse et entrant en apoptose. Les têtards (100μ M) sont plus grands que les têtards contrôles, et présentent un défaut de formation de la tête et des yeux. Ne s'agissant que d'expériences préliminaires sans effectif suffisant, il est impossible de conclure que ces phénotypes sont spécifiques de l'utilisation du NaHS. Cependant, les diverses anomalies mises en évidence et le blocage précoce à forte dose de NaHS sont des résultats prometteurs car ils soulignent un probable effet du NaHS sur le développement embryonnaire du xénope. Il sera indispensable dans un premier temps de multiplier les expériences afin de confirmer ces résultats puis dans un second temps de rechercher les protéines et les mécanismes affectés par le H₂S lors du développement

1.2. Effets ROS dépendants des gazotransmetteurs

Il est à noter que les ROS, produites par le H₂S, peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies liées à la grossesse et à la fertilité (Pereira and Martel, 2014; Agarwal et al., 2003). *In vitro*, les ROS sont responsables d'une baisse des taux de fécondation des gamètes femelles. Les ROS influent sur la régulation du Ca²⁺ ce qui perturbe le développement de l'embryon après la fécondation des ovocytes âgés et peut entrainer la mort (Takahashi et al., 2013). De nombreuses études ont démontré un retard de développement des embryons préimplantés provenant d'une culture *in vitro* par rapport aux embryons *in vivo*. Cela pourrait s'expliquer par la plus faible concentration en oxygène de l'oviducte (2-8%) par rapport aux conditions de culture *in vitro* (approximativement 20%). Cet effet toxique de la concentration d'oxygène a été rapporté chez la souris (Auerbach and Brinster, 1968), le rat (Kishi et al., 1991), le porc (Wright, 1977), le mouton (Thompson et al., 1990), la chèvre (Batt et al., 1991) et l'humain (Noda et al., 1994). Cette inhibition du développement embryonnaire en condition de forte oxygénation est due au stress oxydatif puisque l'addition de chélateurs des radicaux libres (Goto et al., 1993; Noda et al., 1991) et d'agents réducteurs (Takahashi et al., 2002) dans les milieux de culture permet d'entrainer un développement au-delà du stade blastocyste.

Puisque les ROS peuvent être à l'origine d'un retard de développement ou entrainer l'apoptose des embryons, l'implication des ROS produites par le H₂S pourrait être à l'origine des effets observés sur le développement embryonnaire. Des conditions inhibant la production de ROS (*via* l'ajout de SOD et de Catalase) seront des contrôles nécessaires pour discriminer les effets des gazotransmetteurs.

2. Comparaisons des différents modèles

2.1. Maturation ovocytaire

Durant cette thèse, les effets du H_2S sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope ont été étudiés en parallèle de travaux réalisés sur les ovocytes de porc par nos collaborateurs Tchèques. Il a été démontré que l'utilisation de donneurs de H_2S entrainait des effets opposés sur ces deux espèces.

Lors de l'étude portant sur l'ovocyte de xénope l'utilisation du NaHS a entrainé une inhibition dépendante de la dose de la reprise de méiose que celle-ci soit induite par la progestérone ou la micro-injection de cytoplasmes d'ovocytes matures en ovocytes immatures. Les ovocytes traités au NaHS et ne présentant pas de tache de maturation n'ont pas effectués de GVBD et se caractérisent par un profil biochimique d'ovocytes bloqués en prophase I : c'est à dire pas de phosphorylation des protéines Erk et Rsk (MAPK inactive) phosphorylation en Tyr15 de Cdc2 et histone H3 non phosphorylée (MPF inactif). L'activité kinasique du MPF et des MAPKs d'extraits protéiques d'ovocytes matures est diminuée en présence de NaHS à différentes concentrations, mais cette diminution n'est pas significative. À l'inverse, les expériences menées sur les ovocytes de porc ont démontré une accélération de la reprise de méiose en présence de Na₂S. Dans ces ovocytes il existe une augmentation de l'activité kinasique du MPF et des MAPK.

De la même manière l'inhibition des enzymes du métabolisme du H₂S par l'utilisation conjointe de l'AOAA, PAG et KGA entrainent une accélération de la reprise de méiose des ovocytes de xénope et, à l'inverse, entraine une inhibition dépendante de la dose de la reprise de méiose des ovocytes de porc.

2.2. Fécondation

Les donneurs de H₂S entrainent des effets opposés sur la fécondation. Dans le cas du xénope, l'utilisation de NaHS à différentes concentrations lors de la fécondation induit une baisse significative à 500 μ M du taux de fécondation. À forte concentration, 1 mM, on observe un retard dans le passage des stades du développement précoce. Sur les embryons de porc, une concentration de 300 μ M de Na2S augmente de façon significative le pourcentage d'ovocytes activés, mais n'influence pas les stades précoces du développement.

Il existe donc un effet opposé des donneurs de H_2S sur la reprise de méiose, la fécondation et le développement des ovocytes de porc et de xénope. Ces différences pourraient s'expliquer par

l'utilisation de donneurs de H₂S différents. Comme démontré précédemment le NaHS est un donneur de H₂S plus fort que le Na₂S. À concentration égale, le NaHS libère jusqu'à deux fois plus de H₂S que le Na₂S. On sait d'ores et déjà que les effets du monoxyde d'azote sur la reprise de méiose sont dépendants de la dose. À forte dose celui-ci entraine une inhibition de la reprise de méiose et une baisse de la concentration interne en monoxyde d'azote de l'ovocyte est nécessaire à la reprise de méiose. Comme détaillé précédemment, les fortes concentrations de NO sont à l'origine du maintien des niveaux de cGMP et cAMP à l'origine du blocage en prophase I de l'ovocyte. Lors de la stimulation hormonale, les concentrations de NO dans le follicule ovarien chutent entrainant une baisse de l'activité GUCY1. On observe alors une diminution des niveaux de cGMP à l'origine de l'activation séquentielle de RAF1, MAP2K1, et MAPK. (Rosselli et al. 1998; Sela-Abramovich et al. 2008; Zamberlam et al. 2014). Au final ces évènements permettent l'inhibition de la PKA ce qui permet la reprise de la méiose. De plus, la réduction des concentrations de GMPc peut aussi conduire à la suppression de son effet inhibiteur sur PDE3A, augmentant l'efficacité de la dégradation de l'AMPc (Nakamura et al. 2002; Bu et al. 2004; Zhang et al. 2009) et donc la baisse d'activité PKA. Un effet similaire pourrait être impliqué dans les effets du H₂S sur la reprise de méiose. Les fortes concentrations de H₂S engendrées par le NaHS seraient la cause de l'inhibition de la reprise de méiose observée dans l'ovocyte de xénope alors que le seuil nécessaire à l'inhibition n'est pas atteint dans le cadre de l'utilisation du Na₂S dans les études portant sur les ovocytes de porc.

L'effet du H₂S sur la maturation des ovocytes de porc semble passer par une augmentation de l'activation des membres de la voie MAPK. En présence de Na₂S, les activités kinases de MAPK et du MPF sont significativement augmentées après 20h et 22h de cinétique respectivement. En début et en fin de maturation les activités kinasiques ne sont pas modifiées entre les ovocytes contrôles et les ovocytes traités. L'absence d'effet du NaHS à différentes concentrations sur l'activité des MAPK et du MPF pourrait donc s'expliquer par le fait que la mesure d'activité a été effectuée en fin de cinétique, lorsque les ovocytes avaient complété leur maturation. Il serait donc intéressant d'effectuer un dosage d'activité kinasique à différents moments de la maturation.

Les différences observées peuvent aussi s'expliquer par la différence de modèle. Le porc est un mammifère alors que le xénope est un amphibien. Il existe des différences entre les ovocytes de ces deux espèces. La fécondation de l'ovocyte de xénope est externe. De même, les ovocytes de xénope ne présentent pas de cellules du cumulus. Bien qu'il ait été prouvé que les cellules du cumulus ne retenaient pas l'hydrogène sulfuré produit par le Na₂S (article 3) et que les effets observés sur les ovocytes de porc étaient bien dus au gazotransmetteur, il se peut qu'une partie de l'H₂S produit soit « neutralisée » par les cellules du cumulus. Au contraire, les ovocytes de xénope étant défolliculés, la majorité du H₂S produit par le NaHS ciblent directement les ovocytes.

Sur les cellules MCF-7, bien que nous n'ayons pas observé d'arrêt marqué dans le cycle cellulaire, nous avons commencé, dans des mises au point préliminaires à étudier les effets du NaHS sur la S-Sulfhydration de Cdc25c. Il sera intéressant de rapprocher les résultats obtenus sur cellules du cumulus de porc, des résultats qui seront obtenus sur ces cellules MCF-7. En effet, les cellules du cumulus sont, contrairement aux ovocytes, elles aussi des cellules somatiques.

3. Cibles potentielles

3.1. Le NO et les protéines du cytosquelette

L'utilisation du SNAP sur les ovocytes de xénope a permis de mettre en évidence que le NO entrainait une mauvaise mise en place des fuseaux. Ces fuseaux, ectopiques et atypiques, présentent une altération de la morphogenèse des microtubules ainsi que des chromosomes non alignés sur la plaque métaphasique. L'ensemble de ses caractéristiques suggère qu'il existerait un effet du NO sur les protéines du cytosquelette dans notre modèle, confirmant des précédents travaux. On peut notamment citer les travaux ayant démontré que lorsque des neurones de vertébrés sont cultivés en présence de SNAP, on observe un effondrement du cône de croissance et une rétractation de l'axone ainsi que la reconfiguration des neurones axonaux. Une voie de transduction des signaux S-Nitrosylation dépendante est impliquée dans la régulation du cytosquelette axonal. MAP1B a été défini comme étant une composante majeure de cette voie. En effet, MP1B est un substrat pour la S- Nitrosylation *in vivo* et dans des cellules en culture. Cette S-Nitrosylation se produit sur la Cys2457 en position C-terminale. Cette Nitrosylation de MAP1B conduit à un renforcement de l'interaction avec les microtubules (Stroissnigg et al., 2007).

Une autre équipe s'est intéressée à l'apoptose induite par les donneurs de NO (SNOC et SNAP) sur les cellules granulaires du cervelet. Elle démontre que l'apoptose dépend de l'activation des récepteurs NMDA, récepteurs ionotropes activés dans des conditions physiologiques par le glutamate et la glycine, entrainant une augmentation de Ca2+ cytosplamique. Mais elle démontre aussi des altérations du cytosquelette expliquées par une dissolution anticipée de filaments d'actine suivie de la dégradation des microtubules et des lamines nucléaires. Tous ces évènements précédant l'apparition de caractéristiques apoptotiques typiques (Bonfoco et al., 1996). Aucune recherche des S-Nitrosylations des protéines du cytosquelette n'a été effectuée dans cette étude cependant une « brief communication » de Jaffrey et al. parue en 2001 dans *Nature Cell biology* tente d'expliquer l'altération du cytosquelette *via* la S-Nitrosylation de l'actine et de la tubuline dans des lysats de cerveau. D'autres études ont démontré plus tard la présence de S-Nitrosylation de protéines du cytosquelettes comme l'actine (Gao et al., 2005; Martínez-Ruiz and Lamas, 2004) et la tubuline (Lefièvre et al., 2007; Gao et al., 2005).

Les effets du NO sur le cytosquelette ne se limitent pas au cerveau : les globules rouges (RBC) possèdent une NOS (NOS - RBC) dont l'activation dépend de la PI3- kinase. Le NO produit présente des fonctions biologiques importantes comme le maintien de la déformabilité (capacité qu'ont les globules rouges à pouvoir se déformer sous l'effet d'un stress sans se rompre). Grâce à l'utilisation de donneur de NO, le SNP, il a été prouvé que le NO produit par le NO synthase des RBC modifie la déformabilité par la S- Nitrosylation directe de protéines du cytosquelette, comme par exemple les α - et β – spectrins (Grau et al., 2013).

Grâce à l'utilisation d'un biotin-switch permettant l'étude des protéines S-Nitrosylées, il serait possible de cribler la S-Nitrosylation des protéines du cytosquelette impliquées dans la migration de la vésicule germinative et la morphogenèse du fuseau de l'ovocyte de xénope.

3.2. Les MAPKs, une autre cible potentielle du NO.

Les MAPKs interviennent dans la mise en place du fuseau chez les amphibiens. Chez le xénope, l'inhibition de la voie MAPK entraine la formation de fuseaux monopolaires dans des extraits ovocytaires, ainsi que des structures de type aster. Une augmentation de la longueur et de la polymérisation des microtubules a été mesurée suggérant un rôle des MAPK dans la régulation de la dynamique des microtubules (Horne and Guadagno, 2003). En présence d'U0126 (U0126 ethanolate), un inhibiteur hautement spécifique de MEK1 et MEK2, aucune structure microtubulaire organisée n'est visible (Bodart et al., 2002b; Gross et al., 2000; Horne and Guadagno, 2003). Le résultat est le même après l'utilisation d'oligonucléotides morpholinos antisens dirigés contre p39^{mos} (Dupré et al., 2002; Bodart et al., 2005) initiateur de la voie MAPK.

Bien que ces phénotypes ne correspondent pas exactement à ceux observés dans nos ovocytes traités au SNAP, il se peut que la perturbation des voies biochimiques, et notamment MAPK, par ce donneur de NO participe également à la mauvaise mise en place du fuseau.

3.3. Cdc25c, une cible du H_2S ?

3.3.1. Différences xCdc25c et hCdc25c

Cdc25c, phosphatase impliquée dans la boucle d'auto-amplification du MPF, semble être ciblée par le H₂S. Si une faible quantité de MPF déclenche la boucle d'auto-amplification, l'injection de hCdc25c n'entraine pas la reprise de méiose (observations personnelles). Cdc25c est la seule isoforme de Cdc25 présente dans les ovocytes de xénope. Par contre, la protéine Cdc25a humaine est capable d'entrainer une reprise de méiose des ovocytes de xénope en présence ou en absence de synthèse protéique. Cependant ces ovocytes s'arrêtent de nouveau en métaphase I et présentent un fuseau non ancré à la membrane. La période prolongée en métaphase I observée dans les ovocytes micro-injectés au Cdc25a résulte d'un équilibre entre la dégradation des cyclines et la synthèse de nouvelles cyclines. Cet équilibre est dû à l'absence d'une baisse de l'activité PKA (Rime et al., 1994). Il est donc possible de tester l'hypothèse que Cdc25a soit S-Sulfhydrée et incapable d'induire la reprise de méiose en présence d'un donneur de H₂S.
Il reste cependant crucial de déterminer les effets du H_2S sur la protéine Cdc25c. Les deux protéines, XCdc25c et hCdc25c, sont différentes et il parait important de tester les effets du NaHS sur du Cdc25c de xénope. Il existe 43% d'homologie entre les deux séquences protéiques. La figure 53 représente la comparaison de séquences de ces deux protéines, on peut notamment voir que les domaines phosphatases sont différents. Par blast les deux séquences de ces domaines phosphatases sont à 68% homologues.

		Cdc2-Cyclin
Human	(1)	MSTELFSSTREEGSSGSGPSFRSNQRKMLNLLLERDTSFTVCPDVPRTPV
Xen	(1)	MAESHIMSSEAPPKTNTGLNFRTNCRMVLNLLREKDCSVTFSPEQPLTPV
		Cdc2-CyclinB
Human	(51)	GKFLGDSANLSILSGGTPKCCLDLSNLSSGEITATQLTTSADLDETGHLD
Xen	(51)	TDLAVGFSNLSTFSGETPKRCLDLSNLGDETAPLPTESPDRISSGKVE
		Cdk2
Human	(101)	SSGLQEVHLAGMNHDQHLMKCSPAQLLCSTPNGLDRGHRK
Xen	(99)	SPKAQFVQFDGLFTPDLGWKAKKCPRGNMNSVLPRLLCSTPSFKKTSGGQ
		PP1 binding Plk1 binding
Human	(141)	RDAMCSSSANKENDNGNLVDS
Xen	(149)	RSVSNKENEGELFKSPNCKPVALLLPQEVVDSQFSPTPENKVDISLDEDC
Human	(162)	EMKYLGSPITTVPKLDKNPNLGED
Xen	(199)	EMNILGSPISADPPCLDGAHDDIKMONLDGFADFFSVDEEEMENPPGAVG
		Хр38ү
		Plk3 Plk1 14-3-3 binding
Human	(186)	QABEISDELMEFSLKDQEAKVSRSGLYRSPSMPENLNRPRLK
Xen	(249)	NLSSSMAILLSGPLLNQDIEVSNVNNISLNRSRLY <u>RSPSMPE</u> KLDRPMLK Cdc2-CyclinB PKA
Human	(228)	QVEKFKDNTIPDKVKKKYFSGQGKLRKGLCLKKTVSLCDIT
Xen	(299)	RPVRPLDSETPVRVKRRRSTSSSLQPQEENFQPQRRGTSLKKTLSLCDVD
	1000	
Human	(269)	ITQMLEEDSNQGHLIGDPSKVCALPTVSGKHQDLKYVNPETVAALLSGKP
Xen	(349)	ISTVLDEDCGHRQLIGDFTKVYALPTVTGRHQDLRYITGETLAALIHGDF
Human	(319)	OGLIEKFYVIDCRYPYRYLGGHIOGALNLYSOFELFNFFLKKPIVPLDTO
Xen	(399)	SSLVEKIFIIDCRYPYEYDGGHIKGALNLHRQEEVTDYFLKQPLTPTMAQ
Human	(369)	KETTTURHOFFESERADEMODOLEEFDESI.NOVDAL.VVDFLVTLKOOVED
Xen	(449)	KRLIIIFHCEFSSERGPKMCRFLREEDRARNEYPSLYYPELYLLKGGYKD
		Dhocobataco domain
		Phosphatase domain
Human	(419)	FFPEYMELCEPQSYCPMHHQDHKTELLRCRSQSKVQEGERQLREQIALLV
xen	(499)	FFFETRELCEPQSYCPMHHQDFREELLKFRTKCKTSVGDRKRREQIARIM
Human	(469)	KDMSP
riumetti		

Figure 53 : Alignement de séquence de la Cdc25c humaine et de xénope. (Numéro swissport P30307 et P30309) utilisant le programme ClustalX. Les résidus phosphorylés par une kinase spécifique sont indiqués en rouge. Les motifs de fixation et de reconnaissance sont entourés. (source : Angel R nebreda)

Il paraitrait donc intéressant de produire une XCdc25c afin de valider l'hypothèse émise dans l'ovocyte de xénope. Pour cela nous avons contacté le professeur Kumagai A. de l'université de Pasadena (Californie) afin qu'elle nous fournisse un plasmide dans l'optique de produire nous même une protéine purifiée. La protéine sera produite dans des bactéries *via* incorporation

du plasmide par choc thermique et sera purifiée sur bille de nickel grâce à la présence d'un Histag. L'activité de la protéine sera vérifiée par micro-injection dans un ovocyte de xénope (celleci doit entrainer la maturation) et par mesure de l'activité *via* la méthode colorimétrique : OMFP.

3.3.2. Effet du H_2S par la S-Sulfhydration

Les effets du H₂S sur la protéine Cdc25c pourraient être directs et résulter d'une S-Sulfhydration. En effet, la protéine Cdc25c présente une cystéine dans son site catalytique indispensable à son activité. Du fait que les phosphatases de type PTPs sont des cibles de la S-Sulfhydration sur des cystéines de leur site actif, (Heneberg, 2014) nous avons voulu vérifier s'il en était de même pour Cdc25c. Pour cela une étude utilisant une méthode biotin switch modifiée a été mise en œuvre. Nos résultats préliminaires obtenus sur les cellules MCF-7 ne permettent pas de conclure que notre traitement au NaHS induit bien une S-Sulfhydration de Cdc25c. L'absence de différence de la S-Sulfhydration entre les conditions avec et sans NaHS, laisse supposer que des mises au point de la technique sont encore nécessaires. Il semble notamment indispensable de mettre en place des contrôles négatifs d'expérience dans lesquels, par exemple, la synthèse d'H2S est inhibée.

Le protocole de détection de la S-Sulfhydration sera validé sur des extraits protéiques d'ovocytes de xénope. En effet, ces ovocytes permettent 1/ d'obtenir une très grande quantité de protéines à partir de peu de matériel biologique et 2/ d'utiliser des concentrations de NaHS plus larges que sur les cellules de cancer du sein permettant ainsi de visualiser plus facilement une augmentation de la S-Sulfhydration entre deux échantillons.

L'absence d'une baisse de S-Sulfhydration à 48h pourrait aussi s'expliquer par un stress des cellules. En effet, différents stress peuvent entrainer la mise en place de S-Sulfhydration de protéines à l'image du stress redox ou le stress du réticulum endoplasmique (Paul and Snyder, 2012). Bien que tout soit mis en place pour éviter un stress des cellules par privation de sérum ou inhibition de contact, il n'est pas inimaginable que les cellules contrôles subissent d'autres pressions provoquées par la formation de clones par exemple. En effet, les cellules sont en général passées toutes les 48h pour éviter la formation de clones, mais la mise en place du protocole demande parfois de laisser les cellules sans passage durant 96 heures (24h de repos, 24h pour la reprise du cycle, puis 48h de cinétique).

3.3.3. ROS et Cdc25.

Nous avons aussi démontré que les effets du H₂S sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope étaient en partie dus à des effets ROS dépendants. En effet, en présence de SOD et de catalase, des enzymes anti-oxydantes, le nombre d'ovocytes n'effectuant pas de reprise de méiose en présence de NaHS à différentes concentrations est réduit. Cependant une baisse, non significative, du nombre d'ovocytes matures par rapport à la condition contrôle induite uniquement à la progestérone est toujours observée. Ces résultats indiquent bien qu'il existe surement un effet ROS mineur dépendant du NaHS sur la maturation des ovocytes.

Il a été démontré que les Cdc25 pouvaient être régulées par les ROS. Cette régulation induirait un blocage des cellules dans le cycle cellulaire en cas de stress redox, le temps de revenir à des conditions de croissance favorable (Rudolph, 2005). L'effet de ROS sur Cdc25 se ferait de façon directe par un effet sur la cystéine du site catalytique. L'oxydation médiée par les ROS des Cdc25 résulte en un pont disulfide réversible grâce à la présence de la thiorédoxine (Rudolph, 2005). Dans la protéine Cdc25C, ces deux cystéines permettant la création du pont disulfide seraient les cystéines 330 et 377 (Savitsky and Finkel, 2002). La formation de ce pont disulfide serait responsable de la dégradation de la protéine Cdc25c par l'intermédiaire de la protéine 14-3-3 puisqu'un mutant pour ces deux cystéines n'est plus fixé par la protéine (Savitsky and Finkel, 2002).



Figure 54 : Mécanisme potentiel d'action du H₂S sur la phosphatase Cdc25c. Le H₂S pourrait entrainer une inhibition de la phosphatase Cdc25c par la production de ROS, directement par S-Sulfhydration de la cystéine 377 présente dans sa sousunité catalytique.

Les effets cytotoxiques du H₂S sont relayés par la production de ROS (Eghbal et al., 2004). On observe une augmentation de la production de H₂O₂ en présence de H₂S. La formation de ROS induite par le H₂S est dépendante de la dose. (Eghbal et al., 2004). Néanmoins H₂O₂ n'empêche pas la reprise de méiose induite par la progestérone (Dehennaut et al., 2007). Ainsi les ROS seules ne peuvent expliquer les effets du H₂S sur les ovocytes. Il se pourrait donc que les ROS et le H₂S travails en synergie. Le H₂S entraine aussi la formation de RSS (Reactive Sulfur Species), équivalent des ROS, mais dérivés de composés soufrés (Gruhlke and Slusarenko, 2012). Ces RSS sont capables d'entrainer la déplétion de glutathion, responsable du maintien du potentiel rédox du cytoplasme, et permettent donc l'activation de la formation de ROS (Truong et al., 2006). Les mécanismes d'action potentiels du H₂S sur la phosphatase Cdc25c sont résumés dans la figure 54.

3.4. Interconnexion hydrogène sulfurée / Monoxyde d'azote.

3.4.1. Les phosphatases, une famille sous influence des gazotransmetteurs ?

Puisque les PTPs ont été identifiées comme cible de la S-Sulfhydration, il est pertinent de s'intéresser plus particulièrement aux effets du H_2S sur l'activité des phosphatases typiquement impliquées dans le cycle cellulaire, i.e. PP1 et PP2A. Les phosphatases PP1 et PP2A sont effets responsables de la déphosphorylation de la sérine 287 de Cdc25c, qui active la protéine-

phosphatase (Margolis et al., 2006, 2003; Hutchins et al., 2002). PP1 et PP2A présentent, à l'instar de Cdc25, des cystéines pouvant être modifiées et affectant leurs activités notamment par oxydo-reduction et formation de ponts disulfides (Fetrow et al., 1999).

Il est intéressant de noter que la plupart des sites cibles de S-Nitrosylation peuvent également subir une S-Sulfydration. La capacité d'une protéine à être à la fois S-Nitrosylée et S-Sulfhydratée pourrait être ancrée dans les propriétés chimiques communes des thiols de ces protéines, thiols servant à promouvoir les deux modifications. Les SH- dérivés du H₂S s'ajoutent de préférence aux anions thiolates (S-) de la protéine, plutôt qu'aux protéines-SH, et donc ciblent en conséquence les résidus Cys des protéines avec de faibles valeurs de pKa, c'est-à-dire où les S- sont prédominant dans la gamme de pH physiologique. La S-Nitrosylation se produit également de manière préférentielle sur les S- et doivent donc préférentiellement cibler la même population de résidus Cys (de faibles pKa). Ainsi, fondée uniquement sur des considérations chimiques (soit sans prendre en compte les contraintes structurelles), on pourrait prévoir une spécificité partagée de la S-Nitrosylation et la S-Sulfhydration, où les deux modifications pourraient préférentiellement se produire sur les mêmes résidus Cys de faible pKa des protéines (Lu et al., 2013).

En s'appuyant sur ces observations, il serait possible de déterminer des cibles de S-Sulfhydration si celles-ci sont capables d'être S-Nitrosylées. L'identification de S-Nitrosylation a déjà été réalisée pour les protéines Cdc25 (Tomko and Lazo, 2008; Foster et al., 2009a; Majumdar et al., 2012) et PP1 (Lefièvre et al., 2007). L'ensemble de ces observations supporte donc l'hypothèse selon laquelle PP1 et Cdc25c puissent être des cibles de la S-Sulfhydration. L'utilisation de biotin-switch, couplée aux anticorps spécifiques de ces protéines phosphatases, permettrait de vérifier cette hypothèse, et ce, pour plusieurs espèces.

3.4.2. Effet potentiel de l'hydrogène sulfuré sur le monoxyde d'azote.

Récemment il a été démontré que le H₂S été capable d'induire une S-Sulfhydration empêchant la S-Nitrosylation en Cys443 et augmente la phosphorylation de eNOS entrainant alors une augmentation d'activité de l'enzyme. L'exposition au NaHS de cellules HEL-293 exprimant eNOS, augmente la phosphorylation de l'enzyme. eNOS peut être présent dans les cellules sous forme de monomère ou de dimère, mais seul les dimères de eNOS sont capables de produire du NO. Chez les cellules sauvages, les protéines eNOS sont présentes principalement sous une forme dimérisées, alors que des souris KO CSE, l'enzyme est majoritairement sous une forme monomérique. En conséquence, la production basale de NO est plus faible dans les cellules endothéliales CSE-KO que dans les cellules endothéliales sauvages. Le H₂S augmenterait l'activité eNOS en induisant la S- sulfhydration de eNOS, permettant sa phosphorylation et inhibant sa S-Nitrosylation et donc l'augmentation de sa dimérisation (Altaany et al., 2014).

Ces résultats pourraient être mis en corrélation avec les expériences effectuées dans l'ovocyte de xénope où l'utilisation d'un donneur de NO entraine une inhibition de la reprise de méiose. Ces effets pourraient venir, en partie, d'une augmentation du NO intra-ovocytaire par un effet sur l'eNOS. En effet, puisqu'une baisse du NO intra-ovocytaire est nécessaire à la reprise de méiose, l'augmentation de la production de NO induite par le H₂S pourrait être un mécanisme supplémentaire d'action du H₂S sur la reprise de méiose.

Cependant ces résultats expliquent plus difficilement les effets d'un donneur de H_2S sur l'ovocyte de porc qui, au contraire, accélère la reprise de méiose.

4. Conclusion générale

Cette étude souligne le rôle direct des gasotransmetteurs sur les ovocytes de Xénope : nous avons notamment démontré pour la première fois les effets délétères du monoxyde d'azote sur la mise en place du fuseau méiotique ainsi que ceux de l'hydrogène sulfuré sur la synthèse des protéines et la reprise méiotique. Cependant, l'ensemble des mécanismes expliquant les effets inhibiteurs du NO et du H₂S sur la reprise de méiose des ovocytes de xénope ainsi que les différences qui existent entre les résultats de ce modèle et ceux de l'ovocyte de porc ne sont pas encore totalement expliqués. Nos études dégagent néanmoins des pistes. L'étude des effets du NO sur les protéines du cytosquelette par un examen de leur S-Nitrosylation permettrait d'expliquer, en partie les effets du NO sur l'apparition de la tâche de maturation (migration de la VG) et la morphogenèse du fuseau de méiose. De même, étudier les effets des gazotransmetteurs sur les phosphatases, en étudiant leur activité en présence de donneur de NO et leur S-Sulfhydration et S-Nitrosylation semble être une priorité.

Nous avons aussi démontré des effets du H₂S sur la fécondation et le développement embryonnaire précoce de xénope. Cependant ces études demandent à être complétées, notamment en ce qui concerne le développement. Il serait dans un premier temps intéressant de déterminer si le H₂S influe sur le taux de fécondation par un effet sur les spermatozoïdes ou sur les ovocytes. Le développement d'un plus grand nombre de têtards mis en présence de NaHS permettra de déterminer si les effets observés sur la taille des embryons et la formation de la tête et des yeux sont des caractéristiques propres au développement en présence d'H₂S. Une fois ces phénotypes déterminés, il sera possible de rechercher les cibles du H₂S au sein des protéines impliquées dans la mise en place de ces tissus.

BIBLIOGRAPHIE

- A. Bagg, M., M. B. Nottle, D. T. Armstrong, and C. G. Grupen. 2009. Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus–oocyte complexes during IVM. *Reprod. Fertil. Dev.* 21:796.
- Abe, K., and H. Kimura. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J. Neurosci. 16:1066–71.
- Abrieu, A., T. Brassac, S. Galas, D. Fisher, J.C. Labbé, and M. Dorée. 1998. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. J. Cell Sci. 111 (Pt 1:1751–7.
- Adler, V., Y. Qu, S.J. Smith, L. Izotova, S. Pestka, H.-F. Kung, M. Lin, F.K. Friedman, L. Chie, D. Chung, M. Boutjdir, and M.R. Pincus. 2005. Functional interactions of Raf and MEK with Jun-N-terminal kinase (JNK) result in a positive feedback loop on the oncogenic Ras signaling pathway. *Biochemistry*. 44:10784–95. doi:10.1021/bi050619j.
- Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79:829–843.
- Agrawal, N., and R. Banerjee. 2008. Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine beta-synthase sumoylation. *PLoS One*. 3:e4032. doi:10.1371/journal.pone.0004032.
- Ahlborg, G. 1951. Hydrogen sulfide poisoning in shale oil industry. AMA. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med. 3:247–66.
- Akbari, M., and H.E. Krokan. Cytotoxicity and mutagenicity of endogenous DNA base lesions as potential cause of human aging. *Mech. Ageing Dev.* 129:353–65. doi:10.1016/j.mad.2008.01.007.
- Alessi, D.R., C. Smythe, and S.M. Keyse. 1993. The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in Xenopus oocyte extracts. *Oncogene*. 8:2015–20.
- Almeida, A., S. Moncada, and J.P. Bolaños. 2004. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat. Cell Biol.* 6:45–51.
- Altaany, Z., Y. Ju, G. Yang, and R. Wang. 2014. The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci. Signal.* 7:ra87.
- Amariglio, F., F. Tchang, M.N. Prioleau, T. Soussi, C. Cibert, and M. Méchali. 1997. A functional analysis of p53 during early development of Xenopus laevis. *Oncogene*. 15:2191–9. doi:10.1038/sj.onc.1201395.
- Amiel, A., L. Leclère, L. Robert, S. Chevalier, and E. Houliston. 2009. Conserved functions for Mos in eumetazoan oocyte maturation revealed by studies in a cnidarian. *Curr. Biol.* 19:305–11. doi:10.1016/j.cub.2008.12.054.
- Amoore, J.E., and E. Hautala. 1983. Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *J. Appl. Toxicol.* 3:272–90.
- Anand, P., and J.S. Stamler. 2012. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J. Mol. Med. (Berl)*. 90:233–44.

- Anger, M., J. Klima, M. Kubelka, R. Prochazka, J. Motlik, and R.M. Schultz. 2004. Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 69:11–6.
- Ashkenazi, H., X. Cao, S. Motola, M. Popliker, M. Conti, and A. Tsafriri. 2005. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 146:77–84.
- Attene-ramos, M.S., G.M. Nava, M.G. Muellner, E.D. Wagner, M.J. Plewa, and H.R. Gaskins. 2010. Research Article DNA Damage and Toxicogenomic Analyses of Hydrogen Sulfide in Human Intestinal Epithelial. 314:304–314. doi:10.1002/em.
- Attene-Ramos, M.S., E.D. Wagner, H.R. Gaskins, and M.J. Plewa. 2007. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol. Cancer Res.* 5:455–9. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0439.
- Auerbach, S., and R.L. Brinster. 1968. Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. *Nature*. 217:465–6.
- Babich, H., H.L. Zuckerbraun, S.T. Hirsch, and L. Blau. 1999. In vitro Cytotoxicity of the Nitric Oxide Donor, S -Nitroso- N -acetyl-peraciUamine, towards Cells from Human Oral Tissue. *Pharmacol. Toxicol.* 84:218–225.
- Baert, F., J.-F. Bodart, B. Bocquet-Muchembled, A. Lescuyer-Rousseau, and J.-P. Vilain. 2003. Xp42(Mpk1) activation is not required for germinal vesicle breakdown but for Raf complete phosphorylation in insulin-stimulated Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 278:49714–20.
- Bai, W.L., B. Singh, W.L. Karshin, R.A. Shonk, and R.B. Arlinghaus. 1991. Phosphorylation of v-mos Ser 47 by the mitotic form of p34cdc2. *Oncogene*. 6:1715–23.
- Baltus, E., J. Brachet, J. Hanocq-Quertier, and E. Hubert. 1973. Cytochemical and Biochemical Studies on Progesterone—Induced Maturation in Amphibian Oocytes. *Differentiation*. 1:127– 143.
- Bandyopadhyay, A., J. Bandyopadhyay, H.H. Choi, H.S. Choi, and H.B. Kwon. 1998. Plasma membrane mediated action of progesterone in amphibian (Rana dybowskii) oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109:293–301. doi:10.1006/gcen.1997.7038.
- Banerjee, R., and C.-G. Zou. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathioninebeta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:144–56. doi:10.1016/j.abb.2004.08.037.
- Basini, G., M. Baratta, N. Ponderato, S. Bussolati, and C. Tamanini. 1998. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod. Fertil. Dev.* 10:471–8.
- Baskar, R., and J. Bian. 2011. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *Eur. J. Pharmacol.* 656:5–9. doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.052.
- Baskar, R., L. Li, and P.K. Moore. 2007. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J*. 21:247–55. doi:10.1096/fj.06-6255com.
- Batt, P.A., D.K. Gardner, and A.W. Cameron. 1991. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 3:601–7.

- Baulieu, E.E., F. Godeau, M. Schorderet, and S. Schorderet-Slatkine. 1978. Steroid-induced meiotic division in Xenopus laevis oocytes: surface and calcium. *Nature*. 275:593–8.
- Bayaa, M., R. a Booth, Y. Sheng, and X.J. Liu. 2000. The classical progesterone receptor mediates Xenopus oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:12607–12.
- Beauchamp, R.O., J.S. Bus, J.A. Popp, C.J. Boreiko, and D.A. Andjelkovich. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 13:25–97.
- Bell, S., C. Klein, L. Müller, S. Hansen, and J. Buchner. 2002. p53 contains large unstructured regions in its native state. *J. Mol. Biol.* 322:917–27.
- Benhar, M., M.T. Forrester, and J.S. Stamler. 2009. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:721–32.
- Berger, L., and A. Wilde. 2013. Glycolytic metabolites are critical modulators of oocyte maturation and viability. *PLoS One*. 8:e77612. doi:10.1371/journal.pone.0077612.
- Besson-Bard, A., A. Pugin, and D. Wendehenne. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:21–39.
- Bettencourt-Dias, M., R. Giet, R. Sinka, A. Mazumdar, W.G. Lock, F. Balloux, P.J. Zafiropoulos, S. Yamaguchi, S. Winter, R.W. Carthew, M. Cooper, D. Jones, L. Frenz, and D.M. Glover. 2004. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature*. 432:980–7.
- Bhambhani, Y., and M. Singh. 1991. Physiological effects of hydrogen sulfide inhalation during exercise in healthy men. J. Appl. Physiol. 71:1872–7.
- Bhatia, M. 2005. Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life*. 57:603–6. doi:10.1080/15216540500217875.
- Bhatia, M., J. Sidhapuriwala, S.M. Moochhala, and P.K. Moore. 2005a. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 145:141–4. doi:10.1038/sj.bjp.0706186.
- Bhatia, M., F.L. Wong, D. Fu, H.Y. Lau, S.M. Moochhala, and P.K. Moore. 2005b. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*. 19:623–5. doi:10.1096/fj.04-3023fje.
- Bhatt, R.R., and J.E. Ferrell. 1999. The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science*. 286:1362–5.
- Bhaumik, S., M.D. Jyothi, and A. Khar. 2000. Differential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells. *FEBS Lett.* 483:78–82.
- Biswas, S., S.N. Kabir, and A.K. Pal. 1998. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J. Reprod. Fertil.* 114:157–61.
- Bloch, W., B.K. Fleischmann, D.E. Lorke, C. Andressen, B. Hops, J. Hescheler, and K. Addicks. 1999. Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc. Res.* 43:675–84.

- Blume, Y.B., Y.A. Krasylenko, O.M. Demchuk, and A.I. Yemets. 2013. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front. Plant Sci.* 4:530.
- Bodart, J.-F., S. Flament, and J.-P. Vilain. 2002a. Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Mol. Reprod. Dev.* 61:570–4.
- Bodart, J.-F.L., F.Y. Baert, C. Sellier, N.S. Duesbery, S. Flament, and J.-P. Vilain. 2005. Differential roles of p39Mos-Xp42Mpk1 cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in Xenopus oocytes. *Dev. Biol.* 283:373–83.
- Bodart, J.-F.L., D. V Gutierrez, A.R. Nebreda, B.D. Buckner, J.R. Resau, and N.S. Duesbery. 2002b. Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of Xenopus tropicalis oocytes. *Dev. Biol.* 245:348–61.
- Bodart, M.J. and J.-F.L. 2012. Aneuploidy in Health and Disease. Z. Storchova, editor. InTech.
- Boehning, D., L. Sedaghat, T.W. Sedlak, and S.H. Snyder. 2004. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *J. Biol. Chem.* 279:30927–30. doi:10.1074/jbc.C400222200.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2:907–16. doi:10.1038/ni1001-907.
- Bogdan, C., M. Röllinghoff, and A. Diefenbach. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173:17–26.
- De Bondt, H.L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H.D. Jones, D.O. Morgan, and S.H. Kim. 1993. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 363:595–602. doi:10.1038/363595a0.
- Bonfoco, E., M. Leist, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S.A. Lipton, and P. Nicotera. 1996. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. J. Neurochem. 67:2484–93.
- Boo, Y.C., S.L. Tressel, and H. Jo. 2007. An improved method to measure nitrate/nitrite with an NO-selective electrochemical sensor. *Nitric Oxide*. 16:306–12.
- Booher, R.N., C.E. Alfa, J.S. Hyams, and D.H. Beach. 1989. The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell*. 58:485–97.
- Bourdon, E., D.-K. Kang, M.C. Ghosh, S.K. Drake, J. Wey, R.L. Levine, and T.A. Rouault. 2003. The role of endogenous heme synthesis and degradation domain cysteines in cellular iron-dependent degradation of IRP2. *Blood Cells, Mol. Dis.* 31:247–255.
- Brachet, J., F. Hanocq, and P. Van Gansen. 1970. A cytochemical and ultrastructural analysis of in vitro maturation in amphibian oocytes. *Dev. Biol.* 21:157–95.
- Bravo, R., C. Otero, C.C. Allende, and J.E. Allende. 1978. Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:1242–6.
- Bredt, D.S. 2003. Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. J. Cell Sci. 116:9-15.
- Bredt, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347:768–70. doi:10.1038/347768a0.

- Bredt, D.S., and S.H. Snyder. 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:9030–3.
- Broillet, M.C. 1999. S-nitrosylation of proteins. Cell. Mol. Life Sci. 55:1036-42.
- Browaeys-Poly, E., K. Cailliau, and J.P. Vilain. 2000. Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in Xenopus laevis oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma. *Eur. J. Biochem.* 267:6256–63.
- Brown, G.C., and C.E. Cooper. 1994. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356:295–8.
- Bu, S., G. Xia, Y. Tao, L. Lei, and B. Zhou. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 207:21–30.
- Bu, S., H. Xie, Y. Tao, J. Wang, and G. Xia. 2004. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthinesupplemented medium through different signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 223:85–93. doi:10.1016/j.mce.2004.04.015.
- Bucciarelli, E., M.G. Giansanti, S. Bonaccorsi, and M. Gatti. 2003. Spindle assembly and cytokinesis in the absence of chromosomes during Drosophila male meiosis. *J. Cell Biol.* 160:993–9. doi:10.1083/jcb.200211029.
- Burnett, A.L., R.P. Allen, C.M. Tempany, G.J. Dover, and C.B. Brendler. 1995. Evaluation of erectile function in men with sickle cell disease. *Urology*. 45:657–63.
- Burnett, A.L., C.J. Lowenstein, D.S. Bredt, T.S. Chang, and S.H. Snyder. 1992. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 257:401–3.
- Burnett, A.L., R.J. Nelson, D.C. Calvin, J.X. Liu, G.E. Demas, S.L. Klein, L.J. Kriegsfeld, V.L. Dawson, T.M. Dawson, and S.H. Snyder. 1996. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol. Med.* 2:288–96.
- Burnett, A.L., S.L. Tillman, T.S. Chang, J.I. Epstein, C.J. Lowenstein, D.S. Bredt, S.H. Snyder, and P.C. Walsh. 1993. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. J. Urol. 150:73–6.
- Buschiazzo, J., T.S. Alonso, M. Biscoglio, S.S. Antollini, and I.C. Bonini. 2011. Nongenomic steroidand ceramide-induced maturation in amphibian oocytes involves functional caveolae-like microdomains associated with a cytoskeletal environment. *Biol. Reprod.* 85:808–22. doi:10.1095/biolreprod.110.090365.
- Cai, W.-J., M.-J. Wang, L.-H. Ju, C. Wang, and Y.-C. Zhu. 2010. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21. *Cell Biol. Int.* 34:565–72. doi:10.1042/CBI20090368.
- Cai, W.-J., M.-J. Wang, P.K. Moore, H.-M. Jin, T. Yao, and Y.-C. Zhu. 2007. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 76:29–40. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.026.

- Cailliau, K., and E. Browaeys-Poly. 2009. A microinjectable biological system, the Xenopus oocyte, as an approach to understanding signal transduction protein function. *Methods Mol. Biol.* 518:43–55.
- Carrier, S., P. Nagaraju, D.M. Morgan, K. Baba, L. Nunes, and T.F. Lue. 1997. Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. *J. Urol.* 157:1088–92.
- Carver, D.J., B. Gaston, K. Deronde, and L.A. Palmer. 2007. Akt-mediated activation of HIF-1 in pulmonary vascular endothelial cells by S-nitrosoglutathione. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37:255–63.
- Castro, A., M. Peter, L. Magnaghi-Jaulin, S. Vigneron, S. Galas, T. Lorca, and J.C. Labbé. 2001. Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in Xenopus oocytes. *Mol. Biol. Cell.* 12:2660–71.
- Chan, G.K., S.-T. Liu, and T.J. Yen. 2005. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol*. 15:589–98. doi:10.1016/j.tcb.2005.09.010.
- Chan, M.K.H., A.T. Tucker, S. Madden, C.E.M. Golding, D.J. Atherton, and M.J. Dillon. 2002. Erythromelalgia: an endothelial disorder responsive to sodium nitroprusside. *Arch. Dis. Child.* 87:229–30.
- Chang, L., B. Geng, F. Yu, J. Zhao, H. Jiang, J. Du, and C. Tang. 2008. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids*. 34:573–85. doi:10.1007/s00726-007-0011-8.
- Charles, A.C. 1994. Glia-neuron intercellular calcium signaling. Dev. Neurosci. 16:196–206.
- Charlesworth, A. 2002. A novel regulatory element determines the timing of Mos mRNA translation during Xenopus oocyte maturation. *EMBO J.* 21:2798–2806. doi:10.1093/emboj/21.11.2798.
- Charlesworth, A., A. Wilczynska, P. Thampi, L.L. Cox, and A.M. MacNicol. 2006. Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during Xenopus oocyte maturation. *EMBO J.* 25:2792–801. doi:10.1038/sj.emboj.7601159.
- Chattopadhyay, M., R. Kodela, N. Nath, A. Barsegian, D. Boring, and K. Kashfi. 2012a. Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF- κ B signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 83:723–32.
- Chattopadhyay, M., R. Kodela, N. Nath, Y.M. Dastagirzada, C.A. Velázquez-Martínez, D. Boring, and K. Kashfi. 2012b. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs inhibit the growth of human cancer cells: a general property and evidence of a tissue type-independent effect. *Biochem. Pharmacol.* 83:715–22.
- Chen, G., H. Suzuki, and A.H. Weston. 1988. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 95:1165–74.
- Chen, J., L. Lin, J. Su, B. Li, X. Zhang, and T. Chen. 2015. Proteomic analysis of G2/M arrest triggered by natural borneol/curcumin in HepG2 cells, the importance of ROS-p53 pathway. *J. Agric. Food Chem.*
- Chen, M., and J.A. Cooper. 1995. Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Cell. Biol.* 15:4727–34.

- Chen, Q., T. Yano, H. Matsumi, Y. Osuga, N. Yano, J. Xu, O. Wada, K. Koga, T. Fujiwara, K. Kugu, and Y. Taketani. 2005a. Cross-Talk between Fas/Fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. *Endocrinology*. 146:808–15.
- Chen, T., L.L. Pearce, J. Peterson, D. Stoyanovsky, and T.R. Billiar. 2005b. Glutathione depletion renders rat hepatocytes sensitive to nitric oxide donor-mediated toxicity. *Hepatology*. 42:598–607.
- Cheng, A., S. Gerry, P. Kaldis, and M.J. Solomon. 2005a. Biochemical characterization of Cdk2-Speedy/Ringo A2. *BMC Biochem*. 6:19.
- Cheng, A., S. Wang, J. Cai, M.S. Rao, and M.P. Mattson. 2003. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev. Biol.* 258:319–333.
- Cheng, A., W. Xiong, J.E. Ferrell, and M.J. Solomon. 2005b. Identification and comparative analysis of multiple mammalian Speedy/Ringo proteins. *Cell Cycle*. 4:155–65.
- Chesnel, F., A. Bourry, D. Boujard, and J. Joly. 1992. A nonsteroidal follicular factor is involved in maturation process of Xenopus laevis oocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86:304–12.
- Chi, H., S.P. Barry, R.J. Roth, J.J. Wu, E.A. Jones, A.M. Bennett, and R.A. Flavell. 2006. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:2274–2279. doi:10.1073/pnas.0510965103.
- Chmelíková, E., M. Jeseta, M. Sedmíková, J. Petr, L. Tůmová, T. Kott, P. Lipovová, and F. Jílek. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18:235–44.
- Choudhari, S.K., M. Chaudhary, S. Bagde, A.R. Gadbail, and V. Joshi. 2013. Nitric oxide and cancer: a review. *World J. Surg. Oncol.* 11:118.
- Clarke, A.R., C.A. Purdie, D.J. Harrison, R.G. Morris, C.C. Bird, M.L. Hooper, and A.H. Wyllie. 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 362:849–52. doi:10.1038/362849a0.
- Coll, O., A. Morales, J.C. Fernández-Checa, and C. Garcia-Ruiz. 2007. Neutral sphingomyelinaseinduced ceramide triggers germinal vesicle breakdown and oxidant-dependent apoptosis in Xenopus laevis oocytes. J. Lipid Res. 48:1924–35. doi:10.1194/jlr.M700069-JLR200.
- Collin, M., and C. Thiemermann. 2005. Hydrogen sulfide and sulfite: novel mediators in the pathophysiology of shock and inflammation. *Shock*. 24:595–6.
- Cook, W.S., and R.H. Unger. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B: a potential leptin resistance factor of obesity. *Dev. Cell*. 2:385–7.
- Cornell-Bell, A.H., S.M. Finkbeiner, M.S. Cooper, and S.J. Smith. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 247:470–3.
- Cornwell, T.L., E. Arnold, N.J. Boerth, and T.M. Lincoln. 1994. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* 267:C1405–13.

- Cortez, D., Y. Wang, J. Qin, and S.J. Elledge. 1999. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*. 286:1162–6.
- Crane, B.R., R.J. Rosenfeld, A.S. Arvai, D.K. Ghosh, S. Ghosh, J.A. Tainer, D.J. Stuehr, and E.D. Getzoff. 1999. N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *EMBO J.* 18:6271–81.
- d'Emmanuele di Villa Bianca, R., R. Sorrentino, P. Maffia, V. Mirone, C. Imbimbo, F. Fusco, R. De Palma, L.J. Ignarro, and G. Cirino. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:4513–8.
- Dani, J.W., A. Chernjavsky, and S.J. Smith. 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron*. 8:429–40.
- Davis, K.L., E. Martin, I. V Turko, and F. Murad. 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:203–36.
- Dehennaut, V., T. Lefebvre, C. Sellier, Y. Leroy, B. Gross, S. Walker, R. Cacan, J.-C. Michalski, J.-P. Vilain, and J.-F. Bodart. 2007. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in Xenopus laevis oocytes. *J. Biol. Chem.* 282:12527–36.
- Deplancke, B., and H.R. Gaskins. 2003. Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *FASEB J*. 17:1310–2. doi:10.1096/fj.02-0883fje.
- Desai, A., and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83–117. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.
- Deshler, J.O., M.I. Highett, and B.J. Schnapp. 1997. Localization of Xenopus Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science*. 276:1128–31.
- Dinapoli, M.R., C.L. Calderon, and D.M. Lopez. 1996. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Exp. Med.* 183:1323–9.
- Dinarina, A., L.H. Perez, A. Davila, M. Schwab, T. Hunt, and A.R. Nebreda. 2005. Characterization of a new family of cyclin-dependent kinase activators. *Biochem. J.* 386:349–55.
- Dineva, J.D., I.M. Vangelov, G.G. Nikolov, R.T. Konakchieva, and M.D. Ivanova. 2008. Nitric oxide stimulates the production of atrial natriuretic peptide and progesterone by human granulosa luteinized cells with an antiapoptotic effect. *Endocr. Regul.* 42:45–51.
- Distrutti, E., L. Sediari, A. Mencarelli, B. Renga, S. Orlandi, E. Antonelli, F. Roviezzo, A. Morelli, G. Cirino, J.L. Wallace, and S. Fiorucci. 2006. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:325–35. doi:10.1124/jpet.105.091595.
- Dorée, M., and T. Hunt. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell Sci.* 115:2461–4.
- Dorman, D.C., K.A. Brenneman, M.F. Struve, K.L. Miller, R.A. James, M.W. Marshall, and P.M.. Foster. 2000. Fertility and developmental neurotoxicity effects of inhaled hydrogen sulfide in Sprague–Dawley rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 22:71–84.

- Drury, K.C., and S. Schorderet-Slatkine. 1975. Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of Xenopus laevis. *Cell*. 4:269–74.
- Dubé, N., and M.L. Tremblay. 2004. Beyond the metabolic function of PTP1B. Cell Cycle. 3:550-3.
- Dubey, P.K., V. Tripathi, R.P. Singh, and G.T. Sharma. 2011. Influence of nitric oxide on in vitro growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (Bubalus bubalis) preantral follicles. J. Vet. Sci. 12:257–65.
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136:153–79. doi:10.1002/jmor.1051360203.
- Dunphy, W.G., L. Brizuela, D. Beach, and J. Newport. 1988. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*. 54:423–31.
- Dupré, A., E.M. Daldello, A.C. Nairn, C. Jessus, and O. Haccard. 2014. Phosphorylation of ARPP19 by protein kinase A prevents meiosis resumption in Xenopus oocytes. *Nat. Commun.* 5:3318.
- Dupré, A., C. Jessus, R. Ozon, and O. Haccard. 2002. Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in Xenopus oocytes. *EMBO J.* 21:4026–36.
- Eckmann, L., F. Laurent, T.D. Langford, M.L. Hetsko, J.R. Smith, M.F. Kagnoff, and F.D. Gillin. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen Giardia lamblia. *J. Immunol.* 164:1478–87.
- Eghbal, M.A., P.S. Pennefather, and P.J. O'Brien. 2004. H2S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. *Toxicology*. 203:69–76.
- Ehrén, I., J. Adolfsson, and N.P. Wiklund. 1994. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urol. Res.* 22:287–90.
- El-Etr, M., S. Schorderet-Slatkine, and E.E. Baulieu. 1979. Meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes initiated by insulin. *Science*. 205:1397–9.
- Elledge, S.J. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science. 274:1664–72.
- Elrod, J.W., J.W. Calvert, J. Morrison, J.E. Doeller, D.W. Kraus, L. Tao, X. Jiao, R. Scalia, L. Kiss, C. Szabo, H. Kimura, C.-W. Chow, and D.J. Lefer. 2007. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:15560–5.
- El-Sherry, T.M., R. Derar, and R. Bakry. 2013. Changes in blood flow in ovine follicles and serum concentration of estradiol 17 beta (E2) and nitric oxide (NO) around the time of ovulation in Ossimi ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 138:188–93.
- Eppig, J.J. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*. 281:483–4.
- Erikson, E., and J.L. Maller. 1989. In vivo phosphorylation and activation of ribosomal protein S6 kinases during Xenopus oocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 264:13711–7.

- Espinoza, F.H., A. Farrell, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D.O. Morgan. 1996. A cyclindependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science*. 273:1714–7.
- Evans, T., E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 33:389–96.
- Evaul, K., M. Jamnongjit, B. Bhagavath, and S.R. Hammes. 2007. Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in Xenopus laevis oocytes by signaling through classical steroid receptors. *Mol. Endocrinol.* 21:186–96. doi:10.1210/me.2006-0301.
- Eyers, P.A., J. Liu, N.R. Hayashi, A.L. Lewellyn, J. Gautier, and J.L. Maller. 2005. Regulation of the G(2)/M transition in Xenopus oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 280:24339–46.
- Fan, H.-Y., M.-Y. Li, C. Tong, D.-Y. Chen, G.-L. Xia, X.-F. Song, H. Schatten, and Q.-Y. Sun. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 63:480–7.
- Fang, L., H.-M. Chang, J.-C. Cheng, P.C.K. Leung, and Y.-P. Sun. 2015. Nitric oxide and cGMP induce COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through CREB signaling pathway. J. Clin. Endocrinol. Metab. 100:E262–9.
- Fattaey, A., and R.N. Booher. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog. Cell Cycle Res.* 3:233–40.
- Ferby, I., M. Blazquez, A. Palmer, R. Eritja, and A.R. Nebreda. 1999. A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in Xenopus oocytes. *Genes Dev.* 13:2177–89.
- Ferguson, A.M., L.S. White, P.J. Donovan, and H. Piwnica-Worms. 2005. Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* 25:2853–60. doi:10.1128/MCB.25.7.2853-2860.2005.
- Ferrell, J.E., and E.M. Machleder. 1998. The biochemical basis of an all-or-none cell fate switch in Xenopus oocytes. *Science*. 280:895–8.
- Ferrell, J.E., M. Wu, J.C. Gerhart, and G.S. Martin. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in Xenopus oocytes and eggs. *Mol. Cell. Biol.* 11:1965–71.
- Fetrow, J.S., N. Siew, and J. Skolnick. 1999. Structure-based functional motif identifies a potential disulfide oxidoreductase active site in the serine/threonine protein phosphatase-1 subfamily. FASEB J. 13:1866–74.
- Finidori-Lepicard, J., S. Schorderet-Slatkine, J. Hanoune, and E.E. Baulieu. 1981. Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in Xenopus laevis oocytes. *Nature*. 292:255–7.
- Fiorucci, S., S. Orlandi, A. Mencarelli, G. Caliendo, V. Santagada, E. Distrutti, L. Santucci, G. Cirino, and J.L. Wallace. 2007. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. *Br. J. Pharmacol.* 150:996–1002. doi:10.1038/sj.bjp.0707193.

- Flament, S., J.F. Bodart, E. Browaeys, M. Bertout, A. Rousseau, J. Gannon, and J.P. Vilain. 1997. Procaine-induced maturation of Xenopus oocytes is mediated by a transient activation of Mphase promoting factor. *Zygote*. 5:11–9.
- Flament, S., E. Browaeys, J.L. Rodeau, M. Bertout, and J.P. Vilain. 1996. Xenopus oocyte maturation: cytoplasm alkalization is involved in germinal vesicle migration. *Int. J. Dev. Biol.* 40:471–6.
- Florin, T.H. 1991. Hydrogen sulphide and total acid-volatile sulphide in faeces, determined with a direct spectrophotometric method. *Clin. Chim. Acta.* 196:127–34.
- Fortune, J.E., P.W. Concannon, and W. Hansel. 1975. Ovarian progesterone levels during in vitro oocyte maturation and ovulation in Xenopus laevis. *Biol. Reprod.* 13:561–7.
- Foster, M.W., M.T. Forrester, and J.S. Stamler. 2009a. A protein microarray-based analysis of Snitrosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:18948–53.
- Foster, M.W., D.T. Hess, and J.S. Stamler. 2009b. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol. Med.* 15:391–404.
- Frank-Vaillant, M., C. Jessus, R. Ozon, J.L. Maller, and O. Haccard. 1999. Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in Xenopus oocytes in response to progesterone. *Mol. Biol. Cell.* 10:3279–88.
- Freeman, R.S., A.N. Meyer, J. Li, and D.J. Donoghue. 1992. Phosphorylation of conserved serine residues does not regulate the ability of mosxe protein kinase to induce oocyte maturation or function as cytostatic factor. *J. Cell Biol.* 116:725–35.
- Freeman, R.S., K.M. Pickham, J.P. Kanki, B.A. Lee, S. V Pena, and D.J. Donoghue. 1989. Xenopus homolog of the mos protooncogene transforms mammalian fibroblasts and induces maturation of Xenopus oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:5805–9.
- Friedberg, E.C., A. Aguilera, M. Gellert, P.C. Hanawalt, J.B. Hays, A.R. Lehmann, T. Lindahl, N. Lowndes, A. Sarasin, and R.D. Wood. 2006. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*. 5:986–96.
- Furuno, N., A. Kawasaki, and N. Sagata. 2003. Expression of cell-cycle regulators during Xenopus oogenesis. *Gene Expr. Patterns*. 3:165–8.
- Furuno, N., Y. Ogawa, J. Iwashita, N. Nakajo, and N. Sagata. 1997. Meiotic cell cycle in Xenopus oocytes is independent of cdk2 kinase. *EMBO J.* 16:3860–5. doi:10.1093/emboj/16.13.3860.
- Gabrielli, B.G., L.M. Roy, and J.L. Maller. 1993. Requirement for Cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science*. 259:1766–9.
- Gaffré, M., A. Martoriati, N. Belhachemi, J.-P. Chambon, E. Houliston, C. Jessus, and A. Karaiskou. 2011. A critical balance between Cyclin B synthesis and Myt1 activity controls meiosis entry in Xenopus oocytes. *Development*. 138:3735–44. doi:10.1242/dev.063974.
- Gao, C., H. Guo, J. Wei, Z. Mi, P.Y. Wai, and P.C. Kuo. 2005. Identification of S-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *Nitric Oxide*. 12:121–6.
- Gard, D.L. 1992. Microtubule organization during maturation of Xenopus oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles. *Dev. Biol.* 151:516–30.

- Garg, U.C., L. Devi, H. Turndorf, L.R. Goldfrank, and M. Bansinath. 1992. Effect of nitric oxide on mitogenesis and proliferation of cerebellar glial cells. *Brain Res.* 592:208–12.
- Garg, U.C., and A. Hassid. 1990. Nitric oxide-generating vasodilators inhibit mitogenesis and proliferation of BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171:474–9.
- Gatei, M., D. Young, K.M. Cerosaletti, A. Desai-Mehta, K. Spring, S. Kozlov, M.F. Lavin, R.A. Gatti, P. Concannon, and K. Khanna. 2000. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat. Genet.* 25:115–9. doi:10.1038/75508.
- Gautier, J., J. Minshull, M. Lohka, M. Glotzer, T. Hunt, and J.L. Maller. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus. *Cell*. 60:487–94.
- Gautier, J., C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse, and J. Maller. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. *Cell*. 54:433–9.
- Gautier, J., M.J. Solomon, R.N. Booher, J.F. Bazan, and M.W. Kirschner. 1991. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. 67:197–211.
- Gebauer, F., and J.D. Richter. 1997. Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *Bioessays*. 19:23–8. doi:10.1002/bies.950190106.
- Gelaude, A., M. Marin, K. Cailliau, M. Jeseta, A. Lescuyer-Rousseau, P. Vandame, J. Nevoral, M. Sedmikova, A. Martoriati, and J.-F. Bodart. 2015. Nitric Oxide Donor s-Nitroso-n-Acetyl Penicillamine (SNAP) Alters Meiotic Spindle Morphogenesis in Xenopus Oocytes. J. Cell. Biochem.
- Geng, B., L. Chang, C. Pan, Y. Qi, J. Zhao, Y. Pang, J. Du, and C. Tang. 2004a. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:756–63.
- Geng, B., J. Yang, Y. Qi, J. Zhao, Y. Pang, J. Du, and C. Tang. 2004b. H2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:362–8.
- George, J., M. Castellazzi, and G. Buttin. 1975. Prophage induction and cell division in E. coli. III. Mutations sfiA and sfiB restore division in tif and lon strains and permit the expression of mutator properties of tif. *Mol. Gen. Genet.* 140:309–332.
- Ghasemi, M., A.R. Dehpour, K.P. Moore, and A.R. Mani. 2012. Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. *Biochem. Pharmacol.* 83:1261–8.
- Godeau, J.F., S. Schorderet-Slatkine, P. Hubert, and E.E. Baulieu. 1978. Induction of maturation in Xenopus laevis oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:2353– 7.
- Goto, Y., Y. Noda, T. Mori, and M. Nakano. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 15:69–75.
- Gotoh, Y., N. Masuyama, K. Dell, K. Shirakabe, and E. Nishida. 1995. Initiation of Xenopus oocyte maturation by activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 270:25898–904.

- Gotoh, Y., and E. Nishida. 1995. The MAP kinase cascade: its role in Xenopus oocytes, eggs and embryos. *Prog. Cell Cycle Res.* 1:287–97.
- Grasselli, F., G. Basini, S. Bussolati, and C. Tamanini. 2002. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. *Reprod. Domest. Anim.* 37:362–8.
- Grau, M., S. Pauly, J. Ali, K. Walpurgis, M. Thevis, W. Bloch, and F. Suhr. 2013. RBC-NOS-Dependent S-Nitrosylation of Cytoskeletal Proteins Improves RBC Deformability. *PLoS One*. 8:e56759.
- Grazul-Bilska, A.T., C. Navanukraw, M.L. Johnson, D.A. Arnold, L.P. Reynolds, and D.A. Redmer. 2006. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction*. 132:579–87.
- Greco, T.M., R. Hodara, I. Parastatidis, H.F.G. Heijnen, M.K. Dennehy, D.C. Liebler, and H. Ischiropoulos. 2006. Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the Snitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:7420–5.
- Greiner, R., Z. Pálinkás, K. Bäsell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy, and T.P. Dick. 2013. Polysulfides link H2S to protein thiol oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* 19:1749–65.
- Grisham, M.B., D.N. Granger, and D.J. Lefer. 1998. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic. Biol. Med.* 25:404–33.
- Groigno, L., G. Bonnec, J. Wolff, J. Joly, and D. Boujard. 1996. Insulin-like growth factor I receptor messenger expression during oogenesis in Xenopus laevis. *Endocrinology*. 137:3856–63. doi:10.1210/endo.137.9.8756557.
- De Groote, M.A., and F.C. Fang. 1995. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin. Infect. Dis.* 21 Suppl 2:S162–5.
- Gross, S.D., M.S. Schwab, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 1999. Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science*. 286:1365–7.
- Gross, S.D., M.S. Schwab, F.E. Taieb, A.L. Lewellyn, Y.W. Qian, and J.L. Maller. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in Xenopus oocytes is mediated by p90(Rsk). *Curr. Biol.* 10:430–8.
- Gross, S.S., and M.S. Wolin. 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57:737–69.
- Gruhlke, M.C.H., and A.J. Slusarenko. 2012. The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiol. Biochem.* 59:98–107.
- Guan, K.L., and E. Butch. 1995. Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270:7197–203.

- Guo, F.H., H.R. De Raeve, T.W. Rice, D.J. Stuehr, F.B. Thunnissen, and S.C. Erzurum. 1995. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:7809–13.
- Guo, K., V. Andrés, and K. Walsh. 1998. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 97:2066–72.
- Guo, Z., and W.G. Dunphy. 2000. Response of Xenopus Cds1 in cell-free extracts to DNA templates with double-stranded ends. *Mol. Biol. Cell*. 11:1535–46.
- Gurdon, J.B. 1974. Gene expression in early animal development: the study of its control by the microinjection of amphibian eggs. *Harvey Lect.* 49–69.
- Gutierrez, G.J., A. Vögtlin, A. Castro, I. Ferby, G. Salvagiotto, Z. Ronai, T. Lorca, and A.R. Nebreda. 2006. Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasomemediated processing and degradation. *Nat. Cell Biol.* 8:1084–94. doi:10.1038/ncb1472.
- Guzmán, M.A., M.A. Navarro, R. Carnicer, A.J. Sarría, S. Acín, C. Arnal, P. Muniesa, J.C. Surra, J.M. Arbonés-Mainar, N. Maeda, and J. Osada. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Hum. Mol. Genet.* 15:3168–76.
- Haccard, O., and C. Jessus. 2006. Redundant pathways for Cdc2 activation in Xenopus oocyte: either cyclin B or Mos synthesis. *EMBO Rep.* 7:321–5. doi:10.1038/sj.embor.7400611.
- Haccard, O., C. Jessus, X. Cayla, J. Goris, W. Merlevede, and R. Ozon. 1990. In vivo activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the Xenopus oocyte. *Eur. J. Biochem.* 192:633–42.
- Haccard, O., B. Sarcevic, A. Lewellyn, R. Hartley, L. Roy, T. Izumi, E. Erikson, and J.L. Maller. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. *Science*. 262:1262–5.
- Haendeler, J., J. Hoffmann, V. Tischler, B.C. Berk, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2002. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat. Cell Biol.* 4:743–9.
- Den Haese, G.J., N. Walworth, A.M. Carr, and K.L. Gould. 1995. The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Mol. Biol. Cell*. 6:371–85.
- Hainaut, P., A. Kowalski, S. Giorgetti, V. Baron, and E. Van Obberghen. 1991. Insulin and insulinlike-growth-factor-I (IGF-I) receptors in Xenopus laevis oocytes. Comparison with insulin receptors from liver and muscle. *Biochem. J.* 273 (Pt 3:673–8.
- Hake, L.E., and J.D. Richter. 1994. CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Cell*. 79:617–27.
- Hamad, A.M., S.R. Johnson, and A.J. Knox. 1999. Antiproliferative effects of NO and ANP in cultured human airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 277:L910–8.
- Hansen, D. V, J.J. Tung, and P.K. Jackson. 2006. CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:608–13.

- Hara, M., Y. Abe, T. Tanaka, T. Yamamoto, E. Okumura, and T. Kishimoto. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nat. Commun.* 3:1059.
- Harvey, S.L., A. Charlet, W. Haas, S.P. Gygi, and D.R. Kellogg. 2005. Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell*. 122:407–20. doi:10.1016/j.cell.2005.05.029.
- Harvey, S.L., and D.R. Kellogg. 2003. Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast weel delays entry into mitosis and is required for cell size control. *Curr. Biol.* 13:264–75.
- Hausen, P., and M. Riebesell. 1991. The early development of Xenopus laevis: an atlas of the histology. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 142 pp.
- Heald, R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts. *Nature*. 382:420–5. doi:10.1038/382420a0.
- Heller, R. 1999. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis*. 144:49–57.
- Hellstrom, W.J., M. Bell, R. Wang, and S.C. Sikka. 1994. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil. Steril.* 61:1117–22.
- Hemminki, K., and M.L. Niemi. 1982. Community study of spontaneous abortions: relation to occupation and air pollution by sulfur dioxide, hydrogen sulfide, and carbon disulfide. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 51:55–63.
- Heneberg, P. 2014. Reactive nitrogen species and hydrogen sulfide as regulators of protein tyrosine phosphatase activity. *Antioxid. Redox Signal.* 20:2191–209.
- Hess, D.T., A. Matsumoto, S.-O. Kim, H.E. Marshall, and J.S. Stamler. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:150–66.
- Hess, D.T., and J.S. Stamler. 2012. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J. Biol. Chem.* 287:4411–8.
- Hickey, M.J., K.A. Sharkey, E.G. Sihota, P.H. Reinhardt, J.D. Macmicking, C. Nathan, and P. Kubes. 1997. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.* 11:955–64.
- Hillensjö, T., S.K. Batta, A. Schwartz-Kripner, A.C. Wentz, J. Sulewski, and C.P. Channing. 1978. Inhibitory effect of human follicular fluid upon the maturation of porcine oocytes in culture. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47:1332–5. doi:10.1210/jcem-47-6-1332.
- Hindley, J., and G.A. Phear. 1984. Sequence of the cell division gene CDC2 from Schizosaccharomyces pombe; patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene*. 31:129–34.
- Hirsch, A.R., and G. Zavala. 1999. Long-term effects on the olfactory system of exposure to hydrogen sulphide. *Occup. Environ. Med.* 56:284–7.

- Hochegger, H., A. Klotzbücher, J. Kirk, M. Howell, K. le Guellec, K. Fletcher, T. Duncan, M. Sohail, and T. Hunt. 2001. New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. *Development*. 128:3795–807.
- Hoffmann, I., P.R. Clarke, M.J. Marcote, E. Karsenti, and G. Draetta. 1993. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* 12:53–63.
- Hogg, N. 2010. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.* 49:122–9.
- Horne, M.M., and T.M. Guadagno. 2003. A requirement for MAP kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 161:1021–8.
- Hosoki, R., N. Matsuki, and H. Kimura. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:527–31. doi:10.1006/bbrc.1997.6878.
- Howard, E.L., A. Charlesworth, J. Welk, and A.M. MacNicol. 1999. The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Mol. Cell. Biol.* 19:1990–9.
- Huang, Y., F. Li, W. Tong, A. Zhang, Y. He, T. Fu, and B. Liu. 2010. Hydrogen Sulfide, a Gaseous Transmitter, Stimulates Proliferation of Interstitial Cells of Cajal via Phosphorylation of AKT Protein Kinase. *Tohoku J. Exp. Med.* 221:125–132. doi:10.1620/tjem.221.125.
- Huchon, D., N. Crozet, N. Cantenot, and R. Ozon. 1981. Germinal vesicle breakdown in the Xenopus laevis oocyte: description of a transient microtubular structure. *Reprod. Nutr. Dev.* 21:135–48.
- Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188:2357–68.
- Hutchins, J.R., D. Dikovskaya, and P.R. Clarke. 2002. Dephosphorylation of the inhibitory phosphorylation site S287 in Xenopus Cdc25C by protein phosphatase-2A is inhibited by 14-3-3 binding. *FEBS Lett.* 528:267–271.
- Hutchins, J.R.A., D. Dikovskaya, and P.R. Clarke. 2003. Regulation of Cdc2/cyclin B activation in Xenopus egg extracts via inhibitory phosphorylation of Cdc25C phosphatase by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein [corrected] kinase II. *Mol. Biol. Cell*. 14:4003–14.
- Hyslop, L.A., M. Carroll, V.L. Nixon, A. McDougall, and K.T. Jones. 2001. Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. *Dev. Biol.* 234:216–30.
- Igarashi, M., A. Nagata, S. Jinno, K. Suto, and H. Okayama. 1991. Wee1(+)-like gene in human cells. *Nature*. 353:80–3. doi:10.1038/353080a0.
- Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:9265–9.
- Ikram, H., C.J. Low, I.G. Crozier, and T. Shirlaw. 1992. Hemodynamic effects of nitroprusside on valvular aortic stenosis. *Am. J. Cardiol.* 69:361–6.

- Inoue, D., M. Ohe, Y. Kanemori, T. Nobui, and N. Sagata. 2007. A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of Xenopus laevis eggs. *Nature*. 446:1100–4.
- Ishida, A., T. Sasaguri, C. Kosaka, H. Nojima, and J. Ogata. 1997. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272:10050–7.
- Ishii, I., N. Akahoshi, X.-N. Yu, Y. Kobayashi, K. Namekata, G. Komaki, and H. Kimura. 2004. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem. J.* 381:113–23. doi:10.1042/BJ20040243.
- Ishikawa, K., Y. Hanaoka, Y. Kondo, and K. Imai. 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.
- Isobe, N., T. Maeda, and T. Terada. 1998. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 113:167–72.
- Isoda, M., K. Sako, K. Suzuki, K. Nishino, N. Nakajo, M. Ohe, T. Ezaki, Y. Kanemori, D. Inoue, H. Ueno, and N. Sagata. 2011. Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of Xenopus eggs. *Dev. Cell*. 21:506–19.
- Izumi, T., and J.L. Maller. 1993. Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol. Biol. Cell*. 4:1337–50.
- Izumi, T., D.H. Walker, and J.L. Maller. 1992. Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol. Biol. Cell*. 3:927–39.
- Jablonka-Shariff, A., and L.M. Olson. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139:2944–54.
- Jacobelli, S., J. Hanocq, E. Baltus, and J. Brachet. 1974. Hormone-induced maturation of Xenopus laevis oocytes: effects of different steroids and study of the properties of a progesterone receptor. *Differentiation*. 2:129–35.
- Janicot, M., J.R. Flores-Riveros, and M.D. Lane. 1991. The insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor is responsible for mediating the effects of insulin, IGF-1, and IGF-2 in Xenopus laevis oocytes. *J. Biol. Chem.* 266:9382–91.
- Jäppinen, P., V. Vilkka, O. Marttila, and T. Haahtela. 1990. Exposure to hydrogen sulphide and respiratory function. *Br. J. Ind. Med.* 47:824–8.
- Jeffrey Man, H.S., A.K.Y. Tsui, and P.A. Marsden. 2014. Nitric oxide and hypoxia signaling. *Vitam. Horm.* 96:161–92.
- Ješeta, M., and J.L. Bodart. 2011. Comparing Pig and Amphibian Oocytes : Methodologies for Aneuploidy Detection and Complementary Lessons for MAPK Involvement in Meiotic Spindle Morphogenesis.

- Jeseta, M., M. Marin, H. Tichovska, P. Melicharova, K. Cailliau-Maggio, A. Martoriati, A. Lescuyer-Rousseau, R. Beaujois, J. Petr, M. Sedmikova, and J.-F. Bodart. 2012. Nitric oxide-donor SNAP induces Xenopus eggs activation. *PLoS One*. 7:e41509.
- Jessus, C., and R. Ozon. 2004. How does Xenopus oocyte acquire its competence to undergo meiotic maturation? *Biol. Cell*. 96:187–192. doi:10.1016/j.biolcel.2003.12.007.
- Jiménez, J.L., J. González-Nicolás, S. Alvarez, M. Fresno, and M.A. Muñoz-Fernández. 2001. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. J. Virol. 75:4655–63.
- Johansen, D., K. Ytrehus, and G.F. Baxter. 2006. Exogenous hydrogen sulfide (H2S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K ATP channels. *Basic Res. Cardiol.* 101:53–60.
- Jovanović, A.M., S. Durst, and P. Nick. 2010. Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *J. Exp. Bot.* 61:901–9.
- Kabil, O., Y. Zhou, and R. Banerjee. 2006. Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry*. 45:13528–36. doi:10.1021/bi0615644.
- Kaldis, P., A. Sutton, and M.J. Solomon. 1996. The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell*. 86:553–64.
- Kalejs, M., A. Ivanov, G. Plakhins, M.S. Cragg, D. Emzinsh, T.M. Illidge, and J. Erenpreisa. 2006. Upregulation of meiosis-specific genes in lymphoma cell lines following genotoxic insult and induction of mitotic catastrophe. *BMC Cancer*. 6:6. doi:10.1186/1471-2407-6-6.
- Kalous, J., M. Kubelka, P. Solc, A. Susor, and J. Motlík. 2009. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction*. 138:645–54.
- Karaïskou, A., X. Cayla, O. Haccard, C. Jessus, and R. Ozon. 1998. MPF amplification in Xenopus oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Exp. Cell Res.* 244:491– 500. doi:10.1006/excr.1998.4220.
- Karaïskou, A., C. Jessus, T. Brassac, and R. Ozon. 1999. Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. J. Cell Sci. 112 (Pt 2:3747–56.
- Karaiskou, A., A.-C. Leprêtre, G. Pahlavan, D. Du Pasquier, R. Ozon, and C. Jessus. 2004. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes. *Development*. 131:1543–52. doi:10.1242/dev.01050.
- Karaiskou, A., L.H. Perez, I. Ferby, R. Ozon, C. Jessus, and A.R. Nebreda. 2001. Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. J. Biol. Chem. 276:36028–34. doi:10.1074/jbc.M104722200.
- Karupiah, G., Q.W. Xie, R.M. Buller, C. Nathan, C. Duarte, and J.D. MacMicking. 1993. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science*. 261:1445–8.
- Kery, V., L. Poneleit, and J.P. Kraus. 1998. Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 355:222–32. doi:10.1006/abbi.1998.0723.

- Khan, F.A., and G.K. Das. 2011. Follicular fluid nitric oxide and ascorbic acid concentrations in relation to follicle size, functional status and stage of estrous cycle in buffalo. *Anim. Reprod. Sci.* 125:62–8.
- Kimura, H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:129–33.
- Kimura, H. 2011. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids*. 41:113–21. doi:10.1007/s00726-010-0510-x.
- Kimura, H. 2013. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 63:492–7. doi:10.1016/j.neuint.2013.09.003.
- Kimura, N., Y. Konno, K. Miyoshi, H. Matsumoto, and E. Sato. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 66:707–17.
- Kimura, Y., R. Dargusch, D. Schubert, and H. Kimura. 2006. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8:661–70.
- Kimura, Y., Y.-I. Goto, and H. Kimura. 2010. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox Signal.* 12:1–13.
- Kimura, Y., and H. Kimura. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*. 18:1165–7. doi:10.1096/fj.04-1815fje.
- Kishi, J., Y. Noda, K. Narimoto, Y. Umaoka, and T. Mori. 1991. Block to development in cultured rat 1-cell embryos is overcome using medium HECM-1. *Hum. Reprod.* 6:1445–8.
- Klimp, A.H., H. Hollema, C. Kempinga, A.G.J. van der Zee, E.G.E. de Vries, and T. Daemen. 2001. Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Ovarian Tumors and Tumor-associated Macrophages. *Cancer Res.* 61:7305–7309.
- Knapp, E., and R. Gmeiner. 1977. Reduction of pulmonary hypertension by nitroprusside. *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* 15:75–80.
- Kobayashi, H., J. Minshull, C. Ford, R. Golsteyn, R. Poon, and T. Hunt. 1991. On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in Xenopus laevis. *J. Cell Biol.* 114:755–65.
- Kondoh, K., and E. Nishida. 2007. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1773:1227–37. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.12.002.
- Kosako, H., Y. Gotoh, and E. Nishida. 1994. Mitogen-activated protein kinase kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. *J. Biol. Chem.* 269:28354–8.
- Kosako, H., E. Nishida, and Y. Gotoh. 1993. cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J.* 12:787–94.
- Kosonen, O., H. Kankaanranta, M. Lähde, P. Vuorinen, P. Ylitalo, and E. Moilanen. 1998. Nitric oxide-releasing oxatriazole derivatives inhibit human lymphocyte proliferation by a cyclic GMPindependent mechanism. J. Pharmacol. Exp. Ther. 286:215–20.

- Krejcova, T., M. Smelcova, J. Petr, J.-F. Bodart, M. Sedmikova, J. Nevoral, M. Dvorakova, A. Vyskocilova, I. Weingartova, V. Kucerova-Chrpova, E. Chmelikova, L. Tumova, and F. Jilek. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS One*. 10.
- Krischel, V., D. Bruch-Gerharz, C. Suschek, K.D. Kröncke, T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen. 1998. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. J. Invest. Dermatol. 111:286–91.
- Krishnan, N., C. Fu, D.J. Pappin, and N.K. Tonks. 2011. H2S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal.* 4:ra86.
- Kristjánsdóttir, K., A. Safi, C. Shah, and J. Rudolph. 2006. Autophosphorylation of Ser66 on Xenopus Myt1 is a prerequisite for meiotic inactivation of Myt1. *Cell Cycle*. 5:421–7.
- Kröncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen. 1995. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*. 376:327–43.
- Kumagai, a, P.S. Yakowec, and W.G. Dunphy. 1998. 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. *Mol. Biol. Cell*. 9:345–54.
- Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1991. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell*. 64:903–14.
- Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1996. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science*. 273:1377–80.
- Kumagai, A., and W.G. Dunphy. 1999. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25 service Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. 1067–1072.
- Kuo, R.C., G.T. Baxter, S.H. Thompson, S.A. Stricker, C. Patton, J. Bonaventura, and D. Epel. 2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*. 406:633–6.
- Kwak, J.Y., M.K. Han, K.S. Choi, I.H. Park, S.Y. Park, M.H. Sohn, U.H. Kim, J.R. McGregor, W.E. Samlowski, and C.Y. Yim. 2000. Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell. Immunol.* 203:84–94. doi:10.1006/cimm.2000.1682.
- Larsen, W.J., S.E. Wert, and G.D. Brunner. 1986. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.* 113:517–21.
- Laudański, P., J. Dziecioł, T. Anchim, and S. Wołczyński. 2001. The influence of glyco-nitric oxide conjugate on proliferation of breast cancer cells in vitro. *Folia Histochem. Cytobiol.* 39 Suppl 2:87–8.
- Leckie, C., R. Empson, A. Becchetti, J. Thomas, A. Galione, and M. Whitaker. 2003. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 278:12247–54. doi:10.1074/jbc.M210770200.
- Lee, M.S., S. Ogg, M. Xu, L.L. Parker, D.J. Donoghue, J.L. Maller, and H. Piwnica-Worms. 1992. cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol. Biol. Cell*. 3:73–84.

- Lee, S.C., and R.A. Steinhardt. 1981. pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 85:358–69.
- Lee, Z.W., J. Zhou, C.-S. Chen, Y. Zhao, C.-H. Tan, L. Li, P.K. Moore, and L.-W. Deng. 2011. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One*. 6:e21077. doi:10.1371/journal.pone.0021077.
- Lefer, D.J., S.P. Jones, W.G. Girod, A. Baines, M.B. Grisham, A.S. Cockrell, P.L. Huang, and R. Scalia. 1999. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 276:H1943–50.
- Lefièvre, L., Y. Chen, S.J. Conner, J.L. Scott, S.J. Publicover, W.C.L. Ford, and C.L.R. Barratt. 2007. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: an alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics*. 7:3066–84.
- Lenormand, J.L., B. Benayoun, M. Guillier, M. Vandromme, M.P. Leibovitch, and S.A. Leibovitch. 1997. Mos activates myogenic differentiation by promoting heterodimerization of MyoD and E12 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17:584–93.
- Lenormand, J.L., R.W. Dellinger, K.E. Knudsen, S. Subramani, and D.J. Donoghue. 1999. Speedy: a novel cell cycle regulator of the G2/M transition. *EMBO J*. 18:1869–77. doi:10.1093/emboj/18.7.1869.
- Li, F., P. Sonveaux, Z.N. Rabbani, S. Liu, B. Yan, Q. Huang, Z. Vujaskovic, M.W. Dewhirst, and C.-Y. Li. 2007. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol. Cell*. 26:63–74.
- Li, L., and P.K. Moore. 2008. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol. Sci.* 29:84–90. doi:10.1016/j.tips.2007.11.003.
- Li, L., P. Rose, and P.K. Moore. 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51:169–87. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100505.
- Li, Z., R. Hromchak, and A. Bloch. 1997. Differential expression of proteins regulating cell cycle progression in growth vs. differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1356:149–59.
- Liang, R., W. Yu, J. Du, L. Yang, M. Shang, and J. Guo. 2006. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chin. Med. J. (Engl).* 119:1877–83.
- Liang, R., W.-D. Yu, J.-B. Du, L.-J. Yang, J.-J. Yang, J. Xu, M. Shang, and J.-Z. Guo. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reprod. Toxicol.* 24:89–96.
- Lim, D.S., S.T. Kim, B. Xu, R.S. Maser, J. Lin, J.H. Petrini, and M.B. Kastan. 2000. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 404:613–7. doi:10.1038/35007091.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362:709–15. doi:10.1038/362709a0.
- Lindermayr, C., G. Saalbach, and J. Durner. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137:921–30.

Liu, B. 2007. P53 AND REACTIVE OXYGEN SPECIES : A CONVOLUTED STORY.

- Liu, D.-H., X. Huang, X.-M. Meng, C.-M. Zhang, H.-L. Lu, Y.-C. Kim, and W.-X. Xu. 2014. Exogenous H2 S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulfhydration of KV 4.3, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. *Neurogastroenterol. Motil.* 26:1705–16.
- Liu, J., B. Grimison, A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor Emi2 is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. J. Biol. Chem. 281:34736–41.
- Liu, J., and J.L. Maller. 2005. Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr. Biol.* 15:1458–68.
- Liu, J.X., B. Singh, D. Wlodek, and R.B. Arlinghaus. 1990. Cell cycle-mediated structural and functional alteration of P85gag-mos protein kinase activity. *Oncogene*. 5:171–8.
- Liu, X.J. 2006. Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction. Springer Science & Business Media. 489 pp.
- Liu, Z., and R. Patiño. 1993. High-affinity binding of progesterone to the plasma membrane of Xenopus oocytes: characteristics of binding and hormonal and developmental control. *Biol. Reprod.* 49:980–8.
- Lord, C.J., and A. Ashworth. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 481:287–94. doi:10.1038/nature10760.
- Lowe, S.W., E.M. Schmitt, S.W. Smith, B.A. Osborne, and T. Jacks. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 362:847–9. doi:10.1038/362847a0.
- Lu, C., A. Kavalier, E. Lukyanov, and S.S. Gross. 2013. S-sulfhydration/desulfhydration and Snitrosylation/denitrosylation: a common paradigm for gasotransmitter signaling by H2S and NO. *Methods*. 62:177–81.
- Lu, L., C.A. Bonham, F.G. Chambers, S.C. Watkins, R.A. Hoffman, R.L. Simmons, and A.W. Thomson. 1996. Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J. Immunol.* 157:3577–86.
- Lugg, J., C. Ng, J. Rajfer, and N. González-Cadavid. 1996. Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity. *Am. J. Physiol.* 271:E354–61.
- Lutz, L.B., L.M. Cole, M.K. Gupta, K.W. Kwist, R.J. Auchus, and S.R. Hammes. 2001. Evidence that androgens are the primary steroids produced by Xenopus laevis ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:13728–33.
- MacMicking, J.D., R.J. North, R. LaCourse, J.S. Mudgett, S.K. Shah, and C.F. Nathan. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:5243–8.

- Madgwick, S., D. V Hansen, M. Levasseur, P.K. Jackson, and K.T. Jones. 2006. Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *J. Cell Biol.* 174:791–801.
- Magalhães, C.R., R.E.S. Socodato, and R. Paes-de-Carvalho. 2006. Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24:53–60.
- Majumdar, U., P. Biswas, T. Subhra Sarkar, D. Maiti, and S. Ghosh. 2012. Regulation of cell cycle and stress responses under nitrosative stress in Schizosaccharomyces pombe. *Free Radic. Biol. Med.* 52:2186–200.
- Maller, J.L. 2003. Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science*. 300:594–5. doi:10.1126/science.1083725.
- Maller, J.L., F.R. Butcher, and E.G. Krebs. 1979. Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 254:579–82.
- Maller, J.L., and E.G. Krebs. 1977. Progesterone-stimulated meiotic cell division in Xenopus oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252:1712–8.
- Margolis, S.S., J.A. Perry, D.H. Weitzel, C.D. Freel, M. Yoshida, T.A. Haystead, and S. Kornbluth. 2006. A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. *Mol. Biol. Cell.* 17:1779–89. doi:10.1091/mbc.E05-08-0751.
- Margolis, S.S., S. Walsh, D.C. Weiser, M. Yoshida, S. Shenolikar, and S. Kornbluth. 2003. PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *EMBO J*. 22:5734–45.
- Martin, S.G., T. Laroche, N. Suka, M. Grunstein, and S.M. Gasser. 1999. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell*. 97:621–33.
- Martínez-Ruiz, A., and S. Lamas. 2004. Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 423:192–9.
- Masui, Y. 1974. A cytostatic factor in amphibian oocytes: its extraction and partial characterization. *J. Exp. Zool.* 187:141–7. doi:10.1002/jez.1401870116.
- Masui, Y., and C.L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177:129–45.
- Mateo, J., M. García-Lecea, S. Cadenas, C. Hernández, and S. Moncada. 2003. Regulation of hypoxiainducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem. J.* 376:537–44.
- Maton, G., T. Lorca, J.-A. Girault, R. Ozon, and C. Jessus. 2005. Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in Xenopus oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. J. Cell Sci. 118:2485–94.
- Matsumi, H., T. Koji, T. Yano, N. Yano, O. Tsutsumi, M. Momoeda, Y. Osuga, and Y. Taketani. 1998. Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocr.* J. 45:745–51.

- Matsumoto, A., K.E. Comatas, L. Liu, and J.S. Stamler. 2003. Screening for nitric oxide-dependent protein-protein interactions. *Science*. 301:657–61.
- Matten, W.T., T.D. Copeland, N.G. Ahn, and G.F. Vande Woude. 1996. Positive feedback between MAP kinase and Mos during Xenopus oocyte maturation. *Dev. Biol.* 179:485–92. doi:10.1006/dbio.1996.0277.
- Mattioli, M., L. Gioia, and B. Barboni. 1998. Calcium elevation in sheep cumulus-oocyte complexes after luteinising hormone stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 50:361–9.
- Maul, H., M. Longo, G. Saade, and R. Garfield. 2003. Nitric Oxide and its Role During Pregnancy: From Ovulation to Delivery. *Curr. Pharm. Des.* 9:359–380.
- Mazza, R., T. Pasqua, M.C. Cerra, T. Angelone, and A. Gattuso. 2013. Akt/eNOS signaling and PLN S-sulfhydration are involved in H₂S-dependent cardiac effects in frog and rat. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 305:R443–51.
- Mendez, R., L.E. Hake, T. Andresson, L.E. Littlepage, J. V Ruderman, and J.D. Richter. 2000. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature*. 404:302–7. doi:10.1038/35005126.
- Meyerhof, P.G., and Y. Masui. 1977. Ca and Mg control of cytostatic factors from Rana pipiens oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. *Dev. Biol.* 61:214–29.
- Meyerhof, P.G., and Y. Masui. 1979. Chromosome condensation activity in Rana pipiens eggs matured in vivo and in blastomeres arrested by cytostatic factor (CSF). *Exp. Cell Res.* 123:345–353. doi:10.1016/0014-4827(79)90476-2.
- Miles, E.W., and J.P. Kraus. 2004. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. J. Biol. Chem. 279:29871–4. doi:10.1074/jbc.R400005200.
- Miller, J.J., M.K. Summers, D. V Hansen, M. V Nachury, N.L. Lehman, A. Loktev, and P.K. Jackson. 2006. Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev.* 20:2410–20.
- Mills, K.D., D.A. Sinclair, and L. Guarente. 1999. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell*. 97:609–20.
- Minshull, J., A. Murray, A. Colman, and T. Hunt. 1991. Xenopus oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. J. Cell Biol. 114:767–72.
- Minshull, J., H. Sun, N.K. Tonks, and A.W. Murray. 1994. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in Xenopus egg extracts. *Cell*. 79:475–86.
- Mitchell, J.R., J.H.J. Hoeijmakers, and L.J. Niedernhofer. 2003. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:232–40.
- Mitchell, L.M., C.R. Kennedy, and G.M. Hartshorne. 2004. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. *Hum. Reprod.* 19:30–40.

- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237–42.
- Mochida, S., S. Ikeo, J. Gannon, and T. Hunt. 2009. Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts. *EMBO J.* 28:2777–85.
- Mohri, T., M. Sokabe, and K. Kyozuka. 2008. Nitric oxide (NO) increase at fertilization in sea urchin eggs upregulates fertilization envelope hardening. *Dev. Biol.* 322:251–262. doi:10.1016/j.ydbio.2008.07.023.
- Mok, Y.-Y.P., M.S.B.M. Atan, C. Yoke Ping, W. Zhong Jing, M. Bhatia, S. Moochhala, and P.K. Moore. 2004. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br. J. Pharmacol.* 143:881–9. doi:10.1038/sj.bjp.0706014.
- Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109–42.
- De Moor, C.H., and J.D. Richter. 1997. The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. *Mol. Cell. Biol.* 17:6419–26.
- Mori, N., Y. Nunokawa, Y. Yamada, S. Ikeda, M. Tomonaga, and N. Yamamoto. 1999. Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type-I and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*. 94:2862–70.
- Moses, R.M., and Y. Masui. 1990. Cytostatic factor (CSF) activity in cytosols extracted from Xenopus laevis eggs. *Exp. Cell Res.* 186:66–73.
- Mueller, P.R., T.R. Coleman, and W.G. Dunphy. 1995. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol. Biol. Cell*. 6:119–34.
- Münke, M., J.P. Kraus, T. Ohura, and U. Francke. 1988. The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am. J. Hum. Genet.* 42:550–9.
- Murad, F. 2006. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* 355:2003–11. doi:10.1056/NEJMsa063904.
- Murray, A.W., and M.W. Kirschner. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. 339:275–80. doi:10.1038/339275a0.
- Murray, A.W., M.J. Solomon, and M.W. Kirschner. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*. 339:280–6. doi:10.1038/339280a0.
- Mustafa, A.K., M.M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S.K. Gazi, R.K. Barrow, G. Yang, R. Wang, and S.H. Snyder. 2009. H2S signals through protein S-sulfhydration. *Sci. Signal.* 2:ra72.
- Mustafa, A.K., G. Sikka, S.K. Gazi, J. Steppan, S.M. Jung, A.K. Bhunia, V.M. Barodka, F.K. Gazi, R.K. Barrow, R. Wang, L.M. Amzel, D.E. Berkowitz, and S.H. Snyder. 2011. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ. Res.* 109:1259–68.

- Nagahara, N., M. Nagano, T. Ito, K. Shimamura, T. Akimoto, and H. Suzuki. 2013. Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci. Rep.* 3:1986. doi:10.1038/srep01986.
- Nagai, Y., M. Tsugane, J.-I. Oka, and H. Kimura. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J.* 18:557–9. doi:10.1096/fj.03-1052fje.
- Nakajo, N., T. Oe, K. Uto, and N. Sagata. 1999. Involvement of Chk1 kinase in prophase I arrest of Xenopus oocytes. *Dev. Biol.* 207:432–44.
- Nakajo, N., S. Yoshitome, J. Iwashita, M. Iida, K. Uto, S. Ueno, K. Okamoto, and N. Sagata. 2000. Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes. *Genes Dev.* 14:328–38.
- Nakamura, Y. Nakamura, Y. Yamagata, N. Sugino, H. Takayama, and H. Kato. 2002. Nitric Oxide Inhibits Oocyte Meiotic Maturation. *Biol. Reprod.* 67:1588–1592.
- Nakamura Y., shiro N., Masahiko T., Shuji Y., Yoshiaki T, Hisako S., Norihiro K., H.T. 1999. Changes in Nitric Oxide Synthase Activity in the Ovary of Gonadotropin Treated Rats. The Role of Nitric Oxide during Ovulation. *Endocr. J.* 46:529–538.
- Napoli, C., and L.J. Ignarro. 2009. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch. Pharm. Res.* 32:1103–8.
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 6:3051-64.
- Nathan, C., and Q.W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell. 78:915-8.
- Nebreda, A.R., J. V Gannon, and T. Hunt. 1995. Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of Xenopus oocytes. *EMBO J.* 14:5597–607.
- Nebreda, A.R., D. Martin-Zanca, D.R. Kaplan, L.F. Parada, and E. Santos. 1991. Induction by NGF of meiotic maturation of Xenopus oocytes expressing the trk proto-oncogene product. *Science*. 252:558–61.
- Nelson, R.J., G.E. Demas, P.L. Huang, M.C. Fishman, V.L. Dawson, T.M. Dawson, and S.H. Snyder. 1995. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*. 378:383–6. doi:10.1038/378383a0.
- Nevoral, J., J. Petr, A. Gelaude, J.-F. Bodart, V. Kucerova-Chrpova, M. Sedmikova, T. Krejcova, T. Kolbabova, M. Dvorakova, A. Vyskocilova, I. Weingartova, L. Krivohlavkova, T. Zalmanova, and F. Jilek. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS One*. 9:e99613.
- Ning, N., J. Zhu, Y. Du, X. Gao, C. Liu, and J. Li. 2014. Dysregulation of hydrogen sulphide metabolism impairs oviductal transport of embryos. *Nat. Commun.* 5:4107.
- Nishiyama, T., K. Ohsumi, and T. Kishimoto. 2007. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. *Nature*. 446:1096–9.

- Nishizawa, M., N. Furuno, K. Okazaki, H. Tanaka, Y. Ogawa, and N. Sagata. 1993. Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of Xenopus eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *EMBO J.* 12:4021–7.
- Nishizawa, M., K. Okazaki, N. Furuno, N. Watanabe, and N. Sagata. 1992. The "second-codon rule" and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in Xenopus oocytes. *EMBO J.* 11:2433–46.
- Nisoli, E., E. Clementi, C. Tonello, C. Sciorati, L. Briscini, and M.O. Carruba. 1998. Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. *Br. J. Pharmacol.* 125:888–94.
- Noda, Y., Y. Goto, Y. Umaoka, M. Shiotani, T. Nakayama, and T. Mori. 1994. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil. Steril.* 62:1022–7.
- Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi, and T. Mori. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Dev.* 28:356–60.
- Norbury, C., and P. Nurse. 1990. Controls of cell proliferation in yeast and animals. *Ciba Found*. *Symp.* 150:168–77; discussion 177–83.
- O'Connor, C.M., and L.D. Smith. 1976. Inhibition of oocyte maturation by theophylline: possible mechanism of action. *Dev. Biol.* 52:318–22.
- O'Keefe, S.J., H. Wolfes, A.A. Kiessling, and G.M. Cooper. 1989. Microinjection of antisense c-mos oligonucleotides prevents meiosis II in the maturing mouse egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:7038–42.
- Ohe, M., D. Inoue, Y. Kanemori, and N. Sagata. 2007. Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in Xenopus oocytes. *Dev. Biol.* 303:157–64.
- Ohe, M., Y. Kawamura, H. Ueno, D. Inoue, Y. Kanemori, C. Senoo, M. Isoda, N. Nakajo, and N. Sagata. 2010. Emi2 inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome absolutely requires Emi2 binding via the C-terminal RL tail. *Mol. Biol. Cell*. 21:905–13.
- Oi, Y., M. Imafuku, C. Shishido, Y. Kominato, S. Nishimura, and K. Iwai. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. J. Nutr. 131:2150–6.
- Olds, G.R., J.J. Ellner, L.A. Kearse, J.W. Kazura, and A.A. Mahmoud. 1980. Role of arginase in killing of schistosomula of Schistosoma mansoni. *J. Exp. Med.* 151:1557–62.
- Opresko, L.K., and H.S. Wiley. 1990. Functional reconstitutional of the human epidermal growth factor receptor system in Xenopus oocytes. J. Cell Biol. 111:1661–71.
- Painter, R.B., and B.R. Young. 1980. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:7315–7.
- Palmer, A., A.C. Gavin, and A.R. Nebreda. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 17:5037–47. doi:10.1093/emboj/17.17.5037.

- Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327:524–6.
- Pandey, A.N., A. Tripathi, K. V Premkumar, T.G. Shrivastav, and S.K. Chaube. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. J. Cell. Biochem. 111:521–8.
- Papapetropoulos, A., A. Pyriochou, Z. Altaany, G. Yang, A. Marazioti, Z. Zhou, M.G. Jeschke, L.K. Branski, D.N. Herndon, R. Wang, and C. Szabó. 2009. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:21972–7. doi:10.1073/pnas.0908047106.
- Park, J.-Y., Y.-Q. Su, M. Ariga, E. Law, S.-L.C. Jin, and M. Conti. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 303:682–4.
- Du Pasquier, D., A. Dupré, and C. Jessus. 2011. Unfertilized Xenopus eggs die by Bad-dependent apoptosis under the control of Cdk1 and JNK. *PLoS One*. 6:e23672. doi:10.1371/journal.pone.0023672.
- Patel, P., M. Vatish, J. Heptinstall, R. Wang, and R.J. Carson. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:10.
- Paul, B.D., and S.H. Snyder. 2012. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:499–507.
- Paules, R.S., R. Buccione, R.C. Moschel, G.F. Vande Woude, and J.J. Eppig. 1989. Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:5395–9.
- Pelpel, K., M. Leibovitch, A. Fernandez, and S.A. Leibovitch. 2000. Mutation of MyoD-Ser237 abolishes its up-regulation by c-Mos. *FEBS Lett.* 474:233–7.
- Peng, A., A.L. Lewellyn, and J.L. Maller. 2014. DNA damage signaling in early Xenopus embryos. *Cell Cycle*. 7:3–6. doi:10.4161/cc.7.1.5157.
- Penson, D.F., C. Ng, L. Cai, J. Rajfer, and N.F. González-Cadavid. 1996. Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile function in the rat. *Biol. Reprod.* 55:567–74.
- Perdiguero, E., M.-J. Pillaire, J.-F. Bodart, F. Hennersdorf, M. Frödin, N.S. Duesbery, G. Alonso, and A.R. Nebreda. 2003. Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in Xenopus oocytes and activates Cdc25C. *EMBO J.* 22:5746–56.
- Pereira, A.C., and F. Martel. 2014. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. *Cell Biol. Toxicol.* 30:301–12.
- Pérez-Mongiovi, D., C. Beckhelling, P. Chang, C.C. Ford, and E. Houliston. 2000. Nuclei and microtubule asters stimulate maturation/M phase promoting factor (MPF) activation in Xenopus eggs and egg cytoplasmic extracts. J. Cell Biol. 150:963–74.
- Pervin, S., R. Singh, and G. Chaudhuri. 2001. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A. 98:3583–8.

- Peter, M., J.-C. Labbé, M. Dorée, and E. Mandart. 2002. A new role for Mos in Xenopus oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development*. 129:2129–39.
- Peters, J.-M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:644–56.
- Petr, J., R. Rajmon, E. Chmelíková, M. Tománek, V. Lánská, M. Pribánová, and F. Jílek. 2006. Nitricoxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*. 14:9–16.
- Petr, J., R. Rajmon, J. Rozinek, M. Sedmíková, M. Jeseta, E. Chmelíková, D. Svestková, and F. Jílek. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Mol. Reprod. Dev.* 71:115–22.
- Petr, J., J. Rozinek, F. Jílek, and D. Urbánková. 2000. Activation of porcine oocytes using cyclopiazonic acid, an inhibitor of calcium-dependent ATPases. J. Exp. Zool. 287:304–15.
- Pfeuty, B., J.-F. Bodart, R. Blossey, and M. Lefranc. 2012. A dynamical model of oocyte maturation unveils precisely orchestrated meiotic decisions. *PLoS Comput. Biol.* 8:e1002329. doi:10.1371/journal.pcbi.1002329.
- Pham, C.D., V.B. Vuyyuru, Y. Yang, W. Bai, and B. Singh. 1999. Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-Mos. *Oncogene*. 18:4287–94. doi:10.1038/sj.onc.1202804.
- Piacenza, L., G. Peluffo, and R. Radi. 2001. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in Trypanosoma cruzi: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:7301–6.
- Picard, A., J.C. Labbé, H. Barakat, J.C. Cavadore, and M. Dorée. 1991. Okadaic acid mimics a nuclear component required for cyclin B-cdc2 kinase microinjection to drive starfish oocytes into M phase. J. Cell Biol. 115:337–44.
- Pines, J., and T. Hunter. 1990. p34cdc2: the S and M kinase? New Biol. 2:389-401.
- Pines, J., and T. Hunter. 1991. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 115:1–17.
- Pines, J., and T. Hunter. 1994. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* 13:3772–81.
- Pinto, C.R.F., D.L. Paccamonti, B.E. Eilts, C.S. Venugopal, C.R. Short, L.R. Gentry, D.L. Thompson, and R.A. Godke. 2003. Concentrations of nitric oxide in equine preovulatory follicles before and after administration of human chorionic gonadotropin. *Theriogenology*. 60:819–27.
- Pochart, P., J. Doré, F. Lémann, I. Goderel, and J.C. Rambaud. 1992. Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:225–8.
- Posada, J., N. Yew, N.G. Ahn, G.F. Vande Woude, and J.A. Cooper. 1993. Mos stimulates MAP kinase in Xenopus oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13:2546–53.
- Procházka, R., V. Srsen, E. Nagyová, T. Miyano, and J.E. Flechon. 2000. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol. Reprod. Dev.* 56:63–73.
- Qu, K., S.W. Lee, J.S. Bian, C.-M. Low, and P.T.-H. Wong. 2008. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem. Int.* 52:155–65.
- Ragazzi, E., A. Chinellato, G. Italiano, F. Pagano, and A. Calabrò. 1996. Characterization of in vitro relaxant mechanisms in erectile tissue from rabbits of different ages. *Urol. Res.* 24:317–22.
- Rauh, N.R., A. Schmidt, J. Bormann, E.A. Nigg, and T.U. Mayer. 2005. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature*. 437:1048–52.
- Ray, P.D., B.-W. Huang, and Y. Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24:981–90. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- Rempel, R.E., S.B. Sleight, and J.L. Maller. 1995. Maternal Xenopus Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. J. Biol. Chem. 270:6843–55.
- Reynhout, J.K., and L.D. Smith. 1974. Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone. *Dev. Biol.* 38:394–400.
- Richardson, C.J., E.A. Magee, and J.H. Cummings. 2000. A new method for the determination of sulphide in gastrointestinal contents and whole blood by microdistillation and ion chromatography. *Clin. Chim. Acta*. 293:115–25.
- Rime, H., D. Huchon, V. De Smedt, C. Thibier, K. Galaktionov, C. Jessus, and R. Ozon. 1994. Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into Xenopus prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biol. Cell*. 82:11–22.
- Rinaldi, L., G. Gobbi, M. Pambianco, C. Micheloni, P. Mirandola, and M. Vitale. 2006. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Lab. Invest.* 86:391–7. doi:10.1038/labinvest.3700391.
- Rodeau, J.-L., S. Flament, E. Browaeys, and J.-P. Vilain. 2009. Effect of procaine on membrane potential and intracellular pH in Xenopus laevis oocytes.
- Rolfe, M., M.I. Chiu, and M. Pagano. 1997. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. J. Mol. Med. (Berl). 75:5–17.
- Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:519–29.
- Roos, W.P., and B. Kaina. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* 12:440–50. doi:10.1016/j.molmed.2006.07.007.
- Rosselli, M., R.K. Dubey, B. Imthurn, E. Macas, and P.J. Keller. 1995. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum. Reprod.* 10:1786–90.
- Rosselli, M., P.J. Keller, and R.K. Dubey. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update*. 4:3–24.

- Rotter, V., H. Abutbul, and A. Ben-Ze'ev. 1983. P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *EMBO J.* 2:1041–7.
- Rudolph, J. 2005. Redox regulation of the Cdc25 phosphatases. Antioxid. Redox Signal. 7:761-7.
- Russell, P., and P. Nurse. 1987. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*. 49:559–67.
- Sadler, S.E., J.K. Angleson, and M. Dsouza. 2010. IGF-1 receptors in Xenopus laevis ovarian follicle cells support the oocyte maturation response. *Biol. Reprod.* 82:591–8. doi:10.1095/biolreprod.109.080937.
- Sadler, S.E., and J.L. Maller. 1981. Progesterone inhibits adenylate cyclase in Xenopus oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 256:6368–73.
- Sagata, N. 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *Bioessays*. 19:13–21. doi:10.1002/bies.950190105.
- Sagata, N., I. Daar, M. Oskarsson, S.D. Showalter, and G.F. Vande Woude. 1989a. The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science*. 245:643–6.
- Sagata, N., M. Oskarsson, T. Copeland, J. Brumbaugh, and G.F. Vande Woude. 1988. Function of cmos proto-oncogene product in meiotic maturation in Xenopus oocytes. *Nature*. 335:519–25. doi:10.1038/335519a0.
- Sagata, N., N. Watanabe, G.F. Vande Woude, and Y. Ikawa. 1989b. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*. 342:512–8. doi:10.1038/342512a0.
- Sarkar, R., R.C. Webb, and J.C. Stanley. 1995. Nitric oxide inhibition of endothelial cell mitogenesis and proliferation. *Surgery*. 118:274–9.
- Savitsky, P.A., and T. Finkel. 2002. Redox regulation of Cdc25C. J. Biol. Chem. 277:20535-40.
- Saxton, W.M., D.L. Stemple, R.J. Leslie, E.D. Salmon, M. Zavortink, and J.R. McIntosh. 1984. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* 99:2175–86.
- Scavo, L., A.R. Shuldiner, J. Serrano, R. Dashner, J. Roth, and F. de Pablo. 1991. Genes encoding receptors for insulin and insulin-like growth factor I are expressed in Xenopus oocytes and embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:6214–8.
- Scheel, J., J. Srinivasan, U. Honnert, A. Henske, and T. V Kurzchalia. 1999. Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in Caenorhabditis elegans. *Nat. Cell Biol.* 1:127–9. doi:10.1038/10100.
- Schmidt, A., P.I. Duncan, N.R. Rauh, G. Sauer, A.M. Fry, E.A. Nigg, and T.U. Mayer. 2005. Xenopus polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev.* 19:502– 13.
- Schmitt, A., G.J. Gutierrez, P. Lénárt, J. Ellenberg, and A.R. Nebreda. 2002. Histone H3 phosphorylation during Xenopus oocyte maturation: regulation by the MAP kinase/p90Rsk pathway and uncoupling from DNA condensation. *FEBS Lett.* 518:23–8.

- Schmitt, A., and A.R. Nebreda. 2002. Inhibition of Xenopus oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:4361–6. doi:10.1073/pnas.022056399.
- Schorderet-Slatkine, S., and K.C. Drury. 1973. Progesterone induced maturation in oocytes of Xenopus laevis. Appearance of a "maturation promoting factor" in enucleated oocytes. *Cell Differ*. 2:247–54.
- Schwarz, K.R.L., P.R.L. Pires, L.G. Mesquita, M.R. Chiaratti, and C.L.V. Leal. 2014. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*. 81:556–64.
- Sela-Abramovich, S., D. Galiani, N. Nevo, and N. Dekel. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biol. Reprod.* 78:1111–8. doi:10.1095/biolreprod.107.065490.
- Sellier, C., J.-F. Bodart, S. Flament, F. Baert, J. Gannon, and J.-P. Vilain. 2006. Intracellular acidification delays hormonal G2/M transition and inhibits G2/M transition triggered by thiophosphorylated MAPK in Xenopus oocytes. *J. Cell. Biochem.* 98:287–300.
- Semenza, G.L. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 148:399–408.
- Sen, N., B.D. Paul, M.M. Gadalla, A.K. Mustafa, T. Sen, R. Xu, S. Kim, and S.H. Snyder. 2012. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell*. 45:13–24.
- Sengoku, K., N. Takuma, M. Horikawa, K. Tsuchiya, H. Komori, D. Sharifa, K. Tamate, and M. Ishikawa. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 58:262–8.
- Shan, X., and W.D. Kruger. 1998. Correction of disease-causing CBS mutations in yeast. *Nat. Genet.* 19:91–3. doi:10.1038/ng0598-91.
- Sharma, R. V, E. Tan, S. Fang, M. V Gurjar, and R.C. Bhalla. 1999. NOS gene transfer inhibits expression of cell cycle regulatory molecules in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 276:H1450–9.
- Shaulsky, G., N. Goldfinger, A. Ben-Ze'ev, and V. Rotter. 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10:6565–77.
- Sheets, M.D., M. Wu, and M. Wickens. 1995. Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in Xenopus meiotic maturation. *Nature*. 374:511–6. doi:10.1038/374511a0.
- Shi, S., Q. Li, H. Li, L. Zhang, M. Xu, J. Cheng, C. Peng, C. Xu, and Y. Tian. 2009. Anti-apoptotic action of hydrogen sulfide is associated with early JNK inhibition. *Cell Biol. Int.* 33:1095–101. doi:10.1016/j.cellbi.2009.06.029.
- Shibuya, E.K., and Y. Masui. 1988. Stabilization and enhancement of primary cytostatic factor (CSF) by ATP and NaF in amphibian egg cytosols. *Dev. Biol.* 129:253–64.
- Shibuya, E.K., and Y. Masui. 1989. Molecular characteristics of cytostatic factors in amphibian egg cytosols. *Development*. 106:799–808.

- Shibuya, N., Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara, and H. Kimura. 2009a. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J. Biochem.* 146:623–6. doi:10.1093/jb/mvp111.
- Shibuya, N., M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasawara, T. Togawa, K. Ishii, and H. Kimura. 2009b. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. Antioxid. Redox Signal. 11:703–714.
- Shikano, K., C.J. Long, E.H. Ohlstein, and B.A. Berkowitz. 1988. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247:873–81.
- Shoji, S., N. Yoshida, M. Amanai, M. Ohgishi, T. Fukui, S. Fujimoto, Y. Nakano, E. Kajikawa, and A.C.F. Perry. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *EMBO J.* 25:834–45.
- Sigel, E. 1990. Use of Xenopus oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J. Membr. Biol.* 117:201–21.
- Sinclair, D.A., and P. Oberdoerffer. 2009. The ageing epigenome: damaged beyond repair? *Ageing Res. Rev.* 8:189–98. doi:10.1016/j.arr.2009.04.004.
- Sirinek, K.R., D.K. Adcock, and B.A. Levine. 1989. Simultaneous infusion of nitroglycerin and nitroprusside to offset adverse effects of vasopressin during portosystemic shunting. Am. J. Surg. 157:33–7.
- De Smedt, V., R. Poulhe, X. Cayla, F. Dessauge, A. Karaiskou, C. Jessus, and R. Ozon. 2002. Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in Xenopus oocytes. *J. Biol. Chem.* 277:28592–600. doi:10.1074/jbc.M202742200.
- Smith, L.D., and R.E. Ecker. 1969a. Cytoplasmic regulation in early events of amphibian development. *Proc. Can. Cancer Conf.* 8:103–29.
- Smith, L.D., and R.E. Ecker. 1969b. Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in Rana pipiens. *Dev. Biol.* 19:281–309.
- Smith, L.D., and R.E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with Rana pipiens Oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25:232–47.
- Soleymanlou, N., I. Jurisica, O. Nevo, F. Ietta, X. Zhang, S. Zamudio, M. Post, and I. Caniggia. 2005. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90:4299– 308. doi:10.1210/jc.2005-0078.
- Soussi, T., C. Caron de Fromentel, and P. May. 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*. 5:945–52.
- Spiecker, M., H. Darius, K. Kaboth, F. Hübner, and J.K. Liao. 1998. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J. Leukoc. Biol.* 63:732–9.
- Spolyar, L.W. 1951. Three men overcome by hydrogen sulfide in starch plant. *Ind. Health Mon.* 11:116–7.

- Srilatha, B., P.G. Adaikan, L. Li, and P.K. Moore. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *J. Sex. Med.* 4:1304–11.
- Srilatha, B., P.G. Adaikan, and P.K. Moore. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction--a pilot study. *Eur. J. Pharmacol.* 535:280–2.
- Srilatha, B., L. Hu, G.P. Adaikan, and P.K. Moore. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. J. Sex. Med. 6:1875–84.
- Stenger, S., N. Donhauser, H. Thüring, M. Röllinghoff, and C. Bogdan. 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 183:1501–14.
- Stenger, S., H. Thüring, M. Röllinghoff, and C. Bogdan. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major. J. Exp. Med. 180:783– 93.
- Stéphan, J.P., C. Guillemois, B. Jégou, and F. Bauché. 1995. Nitric oxide production by Sertoli cells in response to cytokines and lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:218–24. doi:10.1006/bbrc.1995.2119.
- Stone, S.L., S.H. Pomerantz, A. Schwartz-Kripner, and C.P. Channing. 1978. Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action. *Biol. Reprod.* 19:585–92.
- Strausfeld, U., A. Fernandez, J.P. Capony, F. Girard, N. Lautredou, J. Derancourt, J.C. Labbe, and N.J. Lamb. 1994. Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* 269:5989–6000.
- Strausfeld, U., J.C. Labbé, D. Fesquet, J.C. Cavadore, A. Picard, K. Sadhu, P. Russell, and M. Dorée. 1991. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature*. 351:242–5. doi:10.1038/351242a0.
- Stroissnigg, H., A. Trančíková, L. Descovich, J. Fuhrmann, W. Kutschera, J. Kostan, A. Meixner, F. Nothias, and F. Propst. 2007. S-nitrosylation of microtubule-associated protein 1B mediates nitric-oxide-induced axon retraction. *Nat. Cell Biol.* 9:1035–1045.
- Sugino, N., S. Takiguchi, M. Ono, H. Tamura, K. Shimamura, Y. Nakamura, R. Tsuruta, D. Sadamitsu, T. Ueda, T. Maekawa, and H. Kato. 1996. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum. Reprod.* 11:2484–7.
- Sugiura, Y., M. Kashiba, K. Maruyama, K. Hoshikawa, R. Sasaki, K. Saito, H. Kimura, N. Goda, and M. Suematsu. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid. Redox Signal*. 7:781–7.
- Sumbayev, V. V. 2003. S-nitrosylation of thioredoxin mediates activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. Arch. Biochem. Biophys. 415:133–6.
- Sun, H., C.H. Charles, L.F. Lau, and N.K. Tonks. 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*. 75:487–493. doi:10.1016/0092-8674(93)90383-2.

- Sun, Q.Y., W.H. Wang, M. Hosoe, T. Taniguchi, D.Y. Chen, and Y. Shioya. 1997. Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca(2+)-independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Dev. Growth Differ*. 39:523–9.
- Sutovský, P., J.E. Fléchon, and A. Pavlok. 1994. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus oophorus. *Reprod. Nutr. Dev.* 34:415–25.
- Sutovský, P., J.E. Fléchon, and A. Pavlok. 1995. F-actin is involved in control of bovine cumulus expansion. *Mol. Reprod. Dev.* 41:521–9.
- Swenson, K.I., K.M. Farrell, and J. V Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in Xenopus oocytes. *Cell*. 47:861–70.
- Szabó, C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat. Rev. Drug Discov. 6:917-35.
- Szabo, C., C. Coletta, C. Chao, K. Módis, B. Szczesny, A. Papapetropoulos, and M.R. Hellmich. 2013. Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-β-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:12474–9.
- Takahashi, M., T. Nagai, N. Okamura, H. Takahashi, and A. Okano. 2002. Promoting effect of betamercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 66:562–7.
- Takahashi, T., H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, K. Matsuo, and H. Kurachi. 2013. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. J. Obstet. Gynaecol. Res. 39:1431–9.
- Tan, S., D. Schubert, and P. Maher. 2001. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. Curr. Top. Med. Chem. 1:497–506.
- Tang, Z., T.R. Coleman, and W.G. Dunphy. 1993. Two distinct mechanisms for negative regulation of the Wee1 protein kinase. *EMBO J.* 12:3427–36.
- Tanner, F.C., P. Meier, H. Greutert, C. Champion, E.G. Nabel, and T.F. Luscher. 2000. Nitric Oxide Modulates Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins : A Cytostatic Strategy for Inhibition of Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation*. 101:1982–1989.
- Taoka, S., S. Ohja, X. Shan, W.D. Kruger, and R. Banerjee. 1998. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J. Biol. Chem.* 273:25179–84.
- Taradash, M.R., and L.B. Jacobson. 1975. Vasodilator therapy of idiopathic lactic acidosis. *N. Engl. J. Med.* 293:468–71.
- Tatsumi, N., M. Fujisawa, M. Kanzaki, Y. Okuda, H. Okada, S. Arakawa, and S. Kamidono. 1997. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology*. 138:994–8. doi:10.1210/endo.138.3.4961.
- Tchang, F., M. Gusse, T. Soussi, and M. Méchali. 1993. Stabilization and expression of high levels of p53 during early development in Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 159:163–72. doi:10.1006/dbio.1993.1230.

- Telfer, J.F., F. Lyall, J.E. Norman, and I.T. Cameron. 1995. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum. Reprod.* 10:19–23.
- Thompson, J.G., A.C. Simpson, P.A. Pugh, P.E. Donnelly, and H.R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89:573–8.
- Thuret, J.Y., J.G. Valay, G. Faye, and C. Mann. 1996. Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell*. 86:565–76.
- Tian, C., F. Ye, L. Wang, Y. Deng, Y. Dong, X. Wang, T. Xu, T. Lei, and X. Wang. 2010. Nitric oxide inhibits ghrelin-induced cell proliferation and ERK1/2 activation in GH3 cells. *Endocrine*. 38:412–6.
- Tian, J., S. Kim, E. Heilig, and J. V Ruderman. 2000. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for Xenopus oocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14358–63.
- Tischer, T., E. Hörmanseder, and T.U. Mayer. 2012. The APC/C inhibitor XErp1/Emi2 is essential for Xenopus early embryonic divisions. *Science*. 338:520–4.
- Tokmakov, A.A., S. Iguchi, T. Iwasaki, and Y. Fukami. 2011. Unfertilized frog eggs die by apoptosis following meiotic exit. *BMC Cell Biol*. 12:56. doi:10.1186/1471-2121-12-56.
- Tomko, R.J., and J.S. Lazo. 2008. Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress. *Cancer Res.* 68:7457–65.
- Tonks, N.K. 2003. PTP1B: from the sidelines to the front lines! FEBS Lett. 546:140-8.
- Tonks, N.K. 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. Cell. 121:667–70.
- Tonks, N.K., and S.K. Muthuswamy. 2007. A brake becomes an accelerator: PTP1B--a new therapeutic target for breast cancer. *Cancer Cell*. 11:214–6.
- Toyoshima-Morimoto, F. 2002. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* 3:341–348. doi:10.1093/embo-reports/kvf069.
- Truong, D.H., M.A. Eghbal, W. Hindmarsh, S.H. Roth, and P.J. O'Brien. 2006. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. *Drug Metab. Rev.* 38:733–44.
- Tsafriri, A., S.H. Pomerantz, and C.P. Channing. 1976. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.* 14:511–6.
- Tung, J.J., D. V Hansen, K.H. Ban, A. V Loktev, M.K. Summers, J.R. Adler, and P.K. Jackson. 2005. A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of Xenopus eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:4318– 23.
- Tunquist, B.J., and J.L. Maller. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17:683–710. doi:10.1101/gad.1071303.
- Tunquist, B.J., M.S. Schwab, L.G. Chen, and J.L. Maller. 2002. The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr. Biol.* 12:1027–33.

- Ulibarri, J.A., P.E. Mozdziak, E. Schultz, C. Cook, and T.M. Best. 1999. Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpencillamine, stimulate myoblast proliferation in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35:215–8.
- Valente, S., E. Bana, E. Viry, D. Bagrel, and G. Kirsch. 2010. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20:5827–30. doi:10.1016/j.bmcl.2010.07.130.
- Vandiver, M.S., B.D. Paul, R. Xu, S. Karuppagounder, F. Rao, A.M. Snowman, H.S. Ko, Y. Il Lee, V.L. Dawson, T.M. Dawson, N. Sen, and S.H. Snyder. 2013. Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin. *Nat. Commun.* 4:1626.
- Vanhoorne, M., A. de Rouck, and D. de Bacquer. 1995. Epidemiological study of eye irritation by hydrogen sulphide and/or carbon disulphide exposure in viscose rayon workers. *Ann. Occup. Hyg.* 39:307–15.
- Verma, A., D.J. Hirsch, C.E. Glatt, G. V Ronnett, and S.H. Snyder. 1993. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*. 259:381–4.
- Viana, K.S., M.C. Caldas-Bussiere, S.G.C. Matta, M.R. Faes, C.S.P. de Carvalho, and C.R. Quirino. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 102:217–27.
- Viry, E., A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diederich, and D. Bagrel. 2011. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *Int. J. Oncol.* 38:1103–11.
- Van Voorhis, B.J., M.S. Dunn, G.D. Snyder, and C.P. Weiner. 1994. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 135:1799–806.
- Van Voorhis, B.J., K. Moore, P.J. Strijbos, S. Nelson, S.A. Baylis, D. Grzybicki, and C.P. Weiner. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. J. Clin. Invest. 96:2719–26.
- Vorlaufer, E., and J.M. Peters. 1998. Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Mol. Biol. Cell*. 9:1817–31.
- Vousden, K.H., and X. Lu. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*. 2:594–604. doi:10.1038/nrc864.
- Wallace, J.L., L. Vong, W. McKnight, M. Dicay, and G.R. Martin. 2009. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology*. 137:569–78, 578.e1. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.012.
- Wang, C., Y. Liu, and J.-M. Cao. 2014. G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids. *Int. J. Mol. Sci.* 15:15412–15425. doi:10.3390/ijms150915412.
- Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basichelix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 92:5510–4.

- Wang, J., and X.J. Liu. 2004. Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in Xenopus oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. J. Cell Sci. 117:5107– 16.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16:1792–8.
- Wang, X.-B., J.-B. Du, and H. Cui. 2015. Signal pathways involved in the biological effects of sulfur dioxide. *Eur. J. Pharmacol.* 764:94–99.
- Wasserman, W.J., and Y. Masui. 1975. Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic naturation in Xenopus oocytes. *Exp. Cell Res.* 91:381–8.
- Watanabe, N., T. Hunt, Y. Ikawa, and N. Sagata. 1991. Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of Xenopus eggs. *Nature*. 352:247–8. doi:10.1038/352247a0.
- Watanabe, N., G.F. Vande Woude, Y. Ikawa, and N. Sagata. 1989. Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of Xenopus eggs. *Nature*. 342:505–11. doi:10.1038/342505a0.
- Weinberg, J.B., M.A. Misukonis, P.J. Shami, S.N. Mason, D.L. Sauls, W.A. Dittman, E.R. Wood, G.K. Smith, B. McDonald, and K.E. Bachus. 1995. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*. 86:1184–95.
- Weinert, T.A., and L.H. Hartwell. 1988. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. *Science*. 241:317–22.
- Wells, N.J., N. Watanabe, T. Tokusumi, W. Jiang, M.A. Verdecia, and T. Hunter. 1999. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1:3361–71.
- White, S.N., M. Jamnongjit, A. Gill, L.B. Lutz, and S.R. Hammes. 2005. Specific modulation of nongenomic androgen signaling in the ovary. *Steroids*. 70:352–60.
- Whiteman, M., J.S. Armstrong, S.H. Chu, S. Jia-Ling, B.-S. Wong, N.S. Cheung, B. Halliwell, and P.K. Moore. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite "scavenger"? J. Neurochem. 90:765–8. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02617.x.
- Whiteman, M., R. Haigh, J.M. Tarr, K.M. Gooding, A.C. Shore, and P.G. Winyard. 2010. Detection of hydrogen sulfide in plasma and knee-joint synovial fluid from rheumatoid arthritis patients: relation to clinical and laboratory measures of inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1203:146–50. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05556.x.
- Williams, M.S., S. Noguchi, P.A. Henkart, and Y. Osawa. 1998. Nitric oxide synthase plays a signaling role in TCR-triggered apoptotic death. *J. Immunol.* 161:6526–31.
- Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3:E28–34. doi:10.1038/35050669.
- Woods, D.B., and K.H. Vousden. 2001. Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.* 264:56–66. doi:10.1006/excr.2000.5141.

- Wright, R.W. 1977. Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. J. Anim. Sci. 44:854–8.
- Wu, Q., Y. Guo, A. Yamada, J.A. Perry, M.Z. Wang, M. Araki, C.D. Freel, J.J. Tung, W. Tang, S.S. Margolis, P.K. Jackson, H. Yamano, M. Asano, and S. Kornbluth. 2007. A role for Cdc2- and PP2A-mediated regulation of Emi2 in the maintenance of CSF arrest. *Curr. Biol.* 17:213–24.
- Wu, X., V. Ranganathan, D.S. Weisman, W.F. Heine, D.N. Ciccone, T.B. O'Neill, K.E. Crick, K.A. Pierce, W.S. Lane, G. Rathbun, D.M. Livingston, and D.T. Weaver. 2000. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature*. 405:477–82. doi:10.1038/35013089.
- Xu, W., K.J. Ladner, and L.D. Smith. 1992. Evidence that Mos protein may not act directly on cyclin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:4573–7.
- Xu, W., L. Liu, G.C. Smith, and I G. Charles. 2000. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents. *Nat. Cell Biol.* 2:339–45.
- Xu, Y., and D. Baltimore. 1996. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.* 10:2401–10.
- Xue, L., G. Farrugia, S.M. Miller, C.D. Ferris, S.H. Snyder, and J.H. Szurszewski. 2000. Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:1851–5.
- Yamagata, Y., Y. Nakamura, K. Umayahara, A. Harada, H. Takayama, N. Sugino, and H. Kato. 2002. Changes in telomerase activity in experimentally induced attetic follicles of immature rats. *Endocr. J.* 49:589–95.
- Yang, G., K. Cao, L. Wu, and R. Wang. 2004. Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H2S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/WAK-1. *J. Biol. Chem.* 279:49199–205. doi:10.1074/jbc.M408997200.
- Yang, G., L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A.K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S.H. Snyder, and R. Wang. 2008. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 322:587–90.
- Yang, G., L. Wu, and R. Wang. 2006. Pro-apoptotic effect of endogenous H2S on human aorta smooth muscle cells. FASEB J. 20:553–5. doi:10.1096/fj.05-4712fje.
- Yang, G., W. Yang, L. Wu, and R. Wang. 2007. H2S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. J. Biol. Chem. 282:16567–76. doi:10.1074/jbc.M700605200.
- Yang, G., K. Zhao, Y. Ju, S. Mani, Q. Cao, S. Puukila, N. Khaper, L. Wu, and R. Wang. 2013. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 18:1906–19.
- Yang, J., E.S. Bardes, J.D. Moore, J. Brennan, M.A. Powers, and S. Kornbluth. 1998. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* 12:2131–43.
- Yang, J., K. Winkler, M. Yoshida, and S. Kornbluth. 1999. Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J.* 18:2174–83.

- Yang, W.D., J. Ando, R. Korenaga, T. Toyooka, and A. Kamiya. 1994. Exogenous Nitric Oxide Inhibits Proliferation of Cultured Vascular Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:1160–1167.
- Yang, Y., C.H. Herrmann, R.B. Arlinghaus, and B. Singh. 1996. Inhibition of v-Mos kinase activity by protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 16:800–9.
- Yew, N., M.L. Mellini, and G.F. Vande Woude. 1992. Meiotic initiation by the mos protein in Xenopus. *Nature*. 355:649–52. doi:10.1038/355649a0.
- Ying, L., and L.J. Hofseth. 2007. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res.* 67:1407–10.
- Yokoo, M., P. Tientha, N. Kimura, K. Niwa, E. Sato, and H. Rodriguez-Martinez. 2002. Localisation of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. *Zygote*. 10:317–26.
- Yonezawa, D., F. Sekiguchi, M. Miyamoto, E. Taniguchi, M. Honjo, T. Masuko, H. Nishikawa, and A. Kawabata. 2007. A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium. *Toxicology*. 241:11–8. doi:10.1016/j.tox.2007.07.020.
- Yoon, S.-J., K.-H. Choi, and K.-A. Lee. 2002. Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 induction and Bax suppression. *Mol. Reprod. Dev.* 61:504–10.
- Yu, J., Y. Zhao, Z. Li, S. Galas, and M.L. Goldberg. 2006. Greatwall kinase participates in the Cdc2 autoregulatory loop in Xenopus egg extracts. *Mol. Cell*. 22:83–91.
- Yue, J., and J.E. Ferrell. 2006. Mechanistic studies of the mitotic activation of Mos. *Mol. Cell. Biol.* 26:5300–9. doi:10.1128/MCB.00273-06.
- Yusuf, S., R. Collins, S. MacMahon, and R. Peto. 1988. Effect of intravenous nitrates on mortality in acute myocardial infarction: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*. 1:1088–92.
- Zackris, U., M. Mikuni, A. Wallin, D. Delbro, L. Hedin, and M. Brannstrom. 1996. Ovary and ovulation: Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum. Reprod.* 11:2667–2673. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019189.
- Zackrisson, U., M. Mikuni, A. Wallin, D. Delbro, L. Hedin, and M. Brännström. 1996. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum. Reprod.* 11:2667–73.
- Zakhary, R., K.D. Poss, S.R. Jaffrey, C.D. Ferris, S. Tonegawa, and S.H. Snyder. 1997. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:14848–53.
- Zamberlam, G., V. Portela, J.F.C. de Oliveira, P.B.D. Gonçalves, and C.A. Price. 2011. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in bovine ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 335:189–94.

- Zamberlam, G., F. Sahmi, and C.A. Price. 2014. Nitric oxide synthase activity is critical for the preovulatory epidermal growth factor-like cascade induced by luteinizing hormone in bovine granulosa cells. *Free Radic. Biol. Med.* 74:237–44.
- Zanardo, R.C.O., V. Brancaleone, E. Distrutti, S. Fiorucci, G. Cirino, and J.L. Wallace. 2006. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 20:2118–20. doi:10.1096/fj.06-6270fje.
- Zhang, M., H. Ouyang, and G. Xia. 2009. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol. Hum. Reprod.* 15:399–409. doi:10.1093/molehr/gap031.
- Zhao, H., S.-J. Chan, Y.-K. Ng, and P.T.-H. Wong. 2013. Brain 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST): Cellular Localization and Downregulation after Acute Stroke. *PLoS One*. 8:e67322.
- Zhao, K., Y. Ju, S. Li, Z. Altaany, R. Wang, and G. Yang. 2014. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO Rep.* 15:792–800.
- Zhao, S., Y.C. Weng, S.S. Yuan, Y.T. Lin, H.C. Hsu, S.C. Lin, E. Gerbino, M.H. Song, M.Z. Zdzienicka, R.A. Gatti, J.W. Shay, Y. Ziv, Y. Shiloh, and E.Y. Lee. 2000. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*. 405:473–7. doi:10.1038/35013083.
- Zhao, W., and R. Wang. 2002. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 283:H474–80. doi:10.1152/ajpheart.00013.2002.
- Zhao, W., J. Zhang, Y. Lu, and R. Wang. 2001. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 20:6008–16. doi:10.1093/emboj/20.21.6008.
- Zhao, X., B. Singh, and R.B. Arlinghaus. 1991. Inhibition of c-mos protein kinase blocks mouse zygotes at the pronuclei stage. *Oncogene*. 6:1423–6.
- Zhi, L., A.D. Ang, H. Zhang, P.K. Moore, and M. Bhatia. 2007. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. *J. Leukoc. Biol.* 81:1322–32. doi:10.1189/jlb.1006599.
- Zhou, Y., C. Ma, J. Karmouch, H.A. Katbi, and X.J. Liu. 2009. Antiapoptotic role for ornithine decarboxylase during oocyte maturation. *Mol. Cell. Biol.* 29:1786–95. doi:10.1128/MCB.01815-08.
- Zhu, X.-Y., H. Gu, and X. Ni. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 4:75–82.
- Ziche, M., A. Parenti, F. Ledda, P. Dell'Era, H.J. Granger, C.A. Maggi, and M. Presta. 1997. Nitric Oxide Promotes Proliferation and Plasminogen Activator Production by Coronary Venular Endothelium Through Endogenous bFGF. *Circ. Res.* 80:845–852.
- Zini, A. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol. Reprod.* 55:935–941. doi:10.1095/biolreprod55.5.935.

Zini, A., M.K. O'Bryan, M.S. Magid, and P.N. Schlegel. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol. Reprod.* 55:935–41.

ANNEXES

Annexe 1 : Phosphatase assay OMPF.

L'OMFP (1 mg) est pesé à peu près précisément et est ajusté puis dilué dans l'Assay Buffer (Tris-Hcl 100 mM, NaCL 40 mM, DTT 1 mM, Glycerol 20%, qsp H₂0 pH ajusté 8,2). Il est à noter que pour 1 mL d'Assay buffer il est nécessaire de peser 0,262 mg d'OMFP. Ajouter la phosphatase à doser dans 1 mL de blanc. Incuber 60 minutes à 37°C et au noir. Ne pas utiliser de shaker. Lire l'absorbance à 477 nm. La DO reflète l'activité phosphatase. Une unité d'activité est équivalente à 1pmol d'OMFP hydrolysée par minute. Afin de déterminer l'activité de la phosphatase l'équation suivante est utilisée :

Activité phosphatase = $[1.0 \times 10^{-3}$ liters X (A₄₇₇/ ε cm)]/time (minutes)/ μ L

Où ε (coefficient d'extinction) de OMFP à A₄₇₇ = 2,72 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹

Annexe 2 : Biotine-Switch modifié

Les cellules sont lysées en présence de tampon HEN (Hepes-NaoH pH 7,7 250 mM, EDTA 1 mM, neocuproine 0,1 mM) supplémenté de déféroxamine (100 μ M) puis centrifugées durant 30 minutes à 4°C et à 13,000g. Les lysats cellulaires sont ensuite dosés par la méthode Bradford. Du blocking buffer (Tampon HEN ajusté à 2,5% SDS et MMTS 20 mM) est ajouté aux lysats cellulaires (240 μ g) et ceux-ci sont placés à 50°C durant 20 minutes avec de nombreuses agitations. Le MMTS est ensuite retiré par un ajout d'acétone (4 volumes de protéines) et les protéines sont précipées à -20°C durant 60 minutes suivies de 30 minutes de centrifugation 13 000 rpm 4°C. Après avoir retiré l'acétone, les protéines sont resuspendues dans du tampon HENS (Tampon HEN supplémenté 1% SDS). À la suspension est ajouté 4 mM de biotin-HPDP dans du dimethyl sulfoxide sans acide ascorbique. Après 3h d'incubation à 25°C, les protéines biotinylées sont précipitées sur les billes steptavidine-agarose, préalablement lavées au tampon HENS durant 1h à température ambiante sur un soleil. Les protéines byotinilées ainsi obtenues sont ensuite étudiées selon le protocole d'immuno-précipitation décrit dans les articleses.

Annexe 3 : Communications orales / par affiches

« Inhibition de l'oncoprotéineCdc25c et de la transition G2/M du cycle cellulaire par l'hydrogène sulfuré » Gelaude A.; Martoriati A.; Cailliau K.; Kolbabova T.; Lescuyer A.; Marin M.; Neroval J.; Vandame P.; Bodart J.F. Cancéropole ; Deauville – France ; 2013

« Hydrogen sulfide effects on cell cycle progression in xenopus oocytes and embryos » Gelaude A.; Martoriati A.; Cailliau K.; Kolbabova T.; Lescuyer A.; Marin M.; Neroval J.; Vandame P.; Bodart J.F. Embo Worshop Oocyte maturation and fertilization , Banyuls-sur-mer – France ; 2013

« Inhibition de l'oncoprotéine Cdc25 et de la transition G2/M du cycle cellulaire par le monoxyde d'azote » Gelaude A.; Martoriati A.; Cailliau K.; Lescuyer A.; Marin M.; Vandame P.; Bodart J.F. Cancéropole ; Deauville – France ; 2014

« Inhibition of oncoprotein Cdc25 and G2 / M transition of the cell cycle by hydrogen sulfide. » Gelaude A.; Martoriati A.; Cailliau K.; Kolbabova T.; Lescuyer A.; Marin M.; Neroval J.; Vandame P.; Bodart J.F.; FEBS EMBO Conference, Paris – France; 201

Annexe 4 : Articles publiés

Gelaude A, Marin M, Cailliau K, Jeseta M, Lescuyer-Rousseau A, Vandame P, Nevoral J, Sedmikova M, Martoriati A, Bodart JF. Nitric Oxide Donor s-Nitroso-n-Acetyl Penicillamine (SNAP) Alters Meiotic Spindle Morphogenesis in Xenopus Oocytes. J Cell Biochem. 2015 Nov

Nevoral J, Petr J, **Gelaude A**, Bodart JF, Kucerova-Chrpova V, Sedmikova M, Krejcova T, Kolbabova T, Dvorakova M, Vyskocilova A, Weingartova I, Krivohlavkova L, Zalmanova T, Jilek F. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. PLoS One. 2014 Jul

Vandame P, Spriet C, Trinel D, **Gelaude A**, Caillau K, Bompard C, Biondi E & Bodart JF. The spatio-temporal dynamics of PKA activity profile during mitosis and its correlation to chromosome segregation. Cell cycle. 2014 Nov.

Marin M, Slaby S, Marchand G, Demuynck S, Friscourt N, **Gelaude A**, Lemière S, Bodart JF. Xenopus laevis oocyte maturation is affected by metal chlorides. Toxicol In Vitro. 2015

RÉSUMÉ

Titre : Rôle de gazotransmetteurs au cours de la reprise de méiose et du développement précoce.

Les gazotransmetteurs sont impliqués comme seconds messagers dans de nombreux processus tels que l'inflammation, le cycle cellulaire ou la vasodilatation. La présence des enzymes responsables du métabolisme des gazotransmetteurs au niveau des organes de la reproduction humaine a ouvert la voie à de nouvelles études portant sur leur importance dans l'ensemble des processus impliqués dans la formation d'un organisme vivant. L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'effet de deux gazotransmetteurs, l'hydrogène sulfuré (H₂S) et le monoxyde d'azote (NO) sur la reprise de méiose, les effecteurs du cycle cellulaire et le développement précoce, en utilisant les propriétés et les avantages d'un modèle amphibien, le xénope.

Une précédente étude de notre équipe a démontré qu'un donneur de NO, le SNAP (S-nitroso-N-acetyl penicillamine), permettait la reprise de méiose en levant le second blocage physiologique en métaphase II de l'ovocyte de *Xenopus* (Jeseta et al. 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus précisément aux effets du NO sur les étapes plus précoces de la méiose (entre les blocages en prophase I et en métaphase II) de l'ovocyte de xénope (mécanismes moléculaires de régulation du cycle cellulaire et morphogenèse du fuseau). L'ensemble de cette étude avait pour but d'apporter des données supplémentaires concernant les mécanismes impliquant le NO dans la méiose des vertébrés. Nous avons pu démontrer, dans un premier temps, que le SNAP entrainait une inhibition de l'apparition de la tache de maturation, témoin de la reprise de méiose, par une diminution du pH du milieu de culture. L'utilisation du NAP, N-acétyl-D, L-pénicillamine disulfure, un produit de dégradation du SNAP ayant les mêmes caractéristiques moléculaires, mais ne libérant pas de NO, a mis en évidence une altération de la morphogenèse du fuseau de méiose dépendante de la libération de NO. Parallèlement, l'étude biochimique en cellule unique a permis de démontrer que les voies de signalisation, à savoir la cascade des MAPK et l'activation du MPF impliquées dans la reprise de méiose, étaient perturbées.

La maturation est un processus indispensable à la préparation de l'ovocyte à la fécondation. Ce phénomène est important afin de préparer, *in vitro*, les ovocytes à la fécondation dans le cadre de biotechnologies reproductives. Dans le cadre d'une comparaison avec d'autres modèle méiotique où le H₂S entraine des effets positifs sur la reprise méiose, nous nous sommes fixés comme objectifs d'étudier plus précisément les effets de ce gazotransmetteur sur les voies de signalisation impliquées dans la levée du blocage des ovocytes en prophase I, ainsi que ses effets sur la fécondation et le développement précoce des embryons de xénope. Deux mécanismes particuliers ont été mis en évidence : (1) une action d'inhibition de la reprise de méiose dépendante de la production de ROS ainsi (2) qu'une action sur l'un des acteurs majeurs de la boucle d'auto-amplification du MPF : Cdc25. Une étude approfondie de ces composés (MPF et Cdc25) a permis de définir que l'action du H₂S sur la boucle d'auto-amplification portait principalement sur la phosphatase. En effet, le MPF n'est ni dissocié, ni inactivé en présence de NaHS (donneur de H₂S), quelle que soit la concentration utilisée. Dans un second temps, nous avons démontré que le NaHS entraine une diminution du pourcentage de fécondation des ovocytes de xénope. De même, il entraine un retard du développement précoce de l'embryogenèse.

Nous avons ainsi pu démontrer des effets inhibiteurs de la reprise de méiose et du développement de deux gazotransmetteurs dans le modèle de l'ovocyte de xénope. De même, nous avons mis en évidence des cibles potentielles parmi les acteurs moléculaires. De façon surprenante, une étude de nos collaborateurs tchèques a démontré des effets inverses de l'hydrogène sulfuré sur la reprise de méiose de l'ovocyte de porc, effets relayés par une modulation des voies MPF et MAPK.