

Comment bloquer l'apoptose des ovocytes ?

Dès la naissance, les ovaires des mammifères femelles contiennent déjà toutes leurs cellules germinales ou ovocytes, mais sous forme immature, bloquées en prophase de la première division méiotique. Après la puberté, périodiquement, quelques ovocytes finiront leur méiose et deviendront des gamètes prêts à être fécondés. Cependant, la majorité d'entre eux dégénéreront avant leur maturation (atrésie folliculaire). La sénescence ovarienne ou ménopause apparaîtra lorsque la totalité des ovocytes sera détruite [1].

Le traitement des jeunes femmes atteintes de cancer se révèle être problématique du fait de l'extrême sensibilité des ovocytes. Par exemple, le traitement de leucémies par irradiation corporelle totale ou par la combinaison d'une chimiothérapie et d'une radiothérapie avant transplantation de moelle osseuse, provoque la destruction des réserves d'ovocytes et, par conséquent, entraîne la stérilité de respectivement 80 % et 99 % des jeunes patientes pubères [2]. Afin d'éviter le traumatisme engendré par cette ménopause post-thérapeutique, il apparaît donc nécessaire de préserver les ovocytes et leurs fonctions biologiques.

Récemment, l'équipe de Jonathan Tilly a démontré que la dégénérescence des ovocytes est due à un processus de mort programmée, ou apoptose, impliquant la protéine Bax, un membre de la famille Bcl-2 [3] ainsi que la protéase Caspase-2 [4]. Même s'il est possible de bloquer l'apoptose en agissant sur ces protéines, il semble toutefois préférable d'intervenir dès les premières étapes de la cascade moléculaire conduisant à l'apoptose des ovocytes.

Les travaux menés par le groupe de Richard Kolesnick ont démontré que les radiations ionisantes et certains agents utilisés dans les chimiothérapies déclenchaient l'apoptose de cel-

lules de différentes lignées somatiques en provoquant la synthèse rapide de céramide ([5] et *m/s* 1999, n° 11, p. 1323). Ce sphingolipide membranaire est issu soit de l'hydrolyse du substrat sphingomyéline par la sphingomyélinase acide (SMPD-1 ou ASMase), soit de sa synthèse *de novo* par la céramide synthétase (figure 1)

Les efforts conjoints de ces deux équipes ont permis de montrer que l'hydrolyse de la sphingomyéline est directement impliquée dans la voie

de transduction induisant l'apoptose ovocytaire [6]. L'étude histomorphométrique révèle que les ovaires des souris âgées de 4 et 42 jours, déficientes pour le gène codant pour la sphingomyélinase acide (*asmase*^{-/-}), contiennent un plus grand nombre de follicules (ovocyte entouré de cellules folliculaires formant le *stratum granulosum*) que ceux des souris sauvages (*asmase*^{+/+}). Afin de déterminer la cause de ce phénomène, les cellules germinales de souris *asmase*^{+/+} et *asmase*^{-/-} âgées de 13 jours et demi,

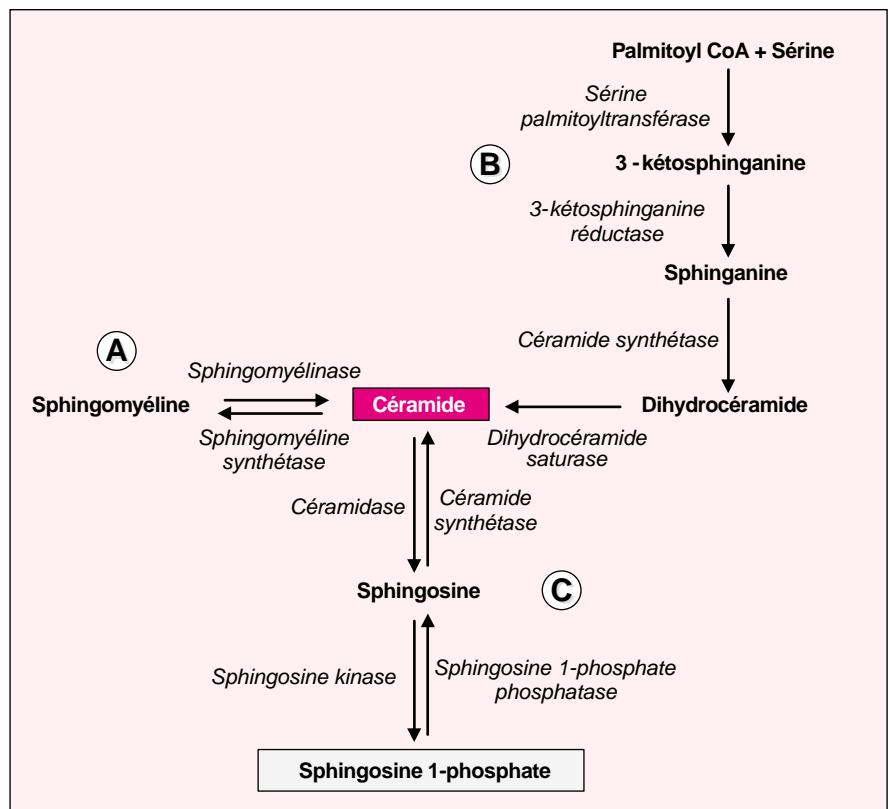


Figure 1. **Métabolisme du céramide et de la sphingosine 1-phosphate.** Le céramide peut être synthétisé soit à partir de l'hydrolyse de la sphingomyéline (A), soit *de novo* à partir de la condensation de sérine et de palmitoyl CoA (B). À son tour, le céramide peut être hydrolysé par la céramidase en sphingosine (C). La synthèse de la sphingosine 1-phosphate se produit après l'addition, par la sphingosine kinase, d'un groupement phosphate au sphingosine (d'après [5]).

ont été isolées et mises en culture. Incubés dans un milieu minimum (c'est-à-dire sans hormone de croissance) pendant 72 heures, plus de 85 % des ovocytes *asmase*^{+/+} meurent par apoptose contre seulement moins de 30% des ovocytes *asmase*^{-/-}. De même, à la différence des cellules germinales sauvages, les ovocytes mutants ne sont pas sensibles à la drogue anticancéreuse doxorubicine. Enfin, la microinjection de l'ADN recombinant du gène *asmase* sauvage dans les ovocytes *asmase*^{-/-} traités par la doxorubicine restaure le phénotype sauvage, et le traitement préalable des cellules *asmase*^{+/+} par un inhibiteur de la céramide synthétase, la funomisine B1, n'empêche pas l'apoptose. Ces résultats démontrent que c'est bien l'augmentation de l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (et non pas la synthèse *de novo* de céramide) qui est responsable de l'apoptose des ovocytes. Le céramide peut aussi être métabolisé en sphingosine puis en sphingosine 1-phosphate (S 1-P) (figure 1) qui, contrairement au céramide, inhibe l'apoptose provoquée par différents stress. Il agit soit comme un second messenger intracellulaire permettant la prolifération et la survie des cellules, soit en tant que ligand des récepteurs membranaires *edg* (pour *endothelial differentiation gene*) qui sont associés aux protéines G_i et stimulent la voie de survie cellulaire dépendante des protéines kinases de la famille MAPK [7]. Dans notre modèle expérimental *ex vivo*, les ovocytes *asmase*^{+/+} traités avec des doses croissantes de sphingosine 1-phosphate deviennent aussi résistants à l'apoptose que les ovocytes *asmase*^{-/-}. Cet effet est spécifique de la sphingosine 1-phosphate, son dérivé, le dihydrosphingosine 1-phosphate n'ayant pas cette propriété. De plus, la préincubation des ovocytes en présence de la toxine extraite de *Bordetella pertussis*, inhibiteur des récepteurs *edg*, n'abolit pas l'effet protecteur de la sphingosine 1-phosphate. Il apparaît donc que le rôle anti-apoptotique de ce métabolite n'est pas dû à l'activation de la voie de transduction des récepteurs *edg* mais plutôt à l'équilibre métabolique intracellulaire entre la sphingosine 1-phosphate et le céramide.

Qu'en est-il de l'effet pharmacologique *in vivo* de la sphingosine 1-phosphate lors d'une thérapie anticancéreuse? Pour répondre à cette question, nous avons injecté ce composé directement dans les bourses ovariennes de souris, 2 heures avant une irradiation corporelle totale de 10 cGy. Deux semaines après l'irradiation, l'étude histologique montre que les ovaires non traités par la sphingosine 1-phosphate sont très fortement endommagés et sont le siège d'une importante atrésie folliculaire. En revanche, les ovaires qui ont été traités par la sphingosine 1-phosphate sont sains et contiennent la même quantité de follicules que celle de souris non irradiées. De plus, des études de fécondation *in vitro* nous ont permis de démontrer que, si les taux de fécondation des ovules provenant d'ovaires irradiés, traités ou non avec le sphingolipide, sont identiques, seuls ceux provenant d'ovaires traités peuvent se développer normalement jusqu'au stade blastocyste. Les mêmes résultats ont été obtenus par fécondation naturelle : en effet, en l'absence de traitement, 54% des souris irradiées avec une dose de 10 cGy sont stériles, tandis que toutes les souris traitées par la sphingosine 1-phosphate sont fertiles. De plus, leur progéniture se développe normalement. La démonstration de l'implication directe de la voie d'hydrolyse de la sphingomyéline dans la cascade moléculaire conduisant à la mort des ovocytes nous a permis de caractériser un métabolite du céramide, la sphingosine 1-phosphate qui se comporte comme un inhibiteur spécifique de l'apoptose ovocytaire provoquée par la radiothérapie. Quoique très prometteurs, ces résultats ont été obtenus sur un modèle murin. Ils devront donc être confirmés en utilisant des tissus ovariens humains avant d'envisager toute utilisation de la sphingosine 1-phosphate dans la prévention de la stérilité féminine post-thérapeutique.

1. Gosden RG, Faddy MJ. Biological bases of premature ovarian failure. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 73-8.
2. Casper RF, Jurisicova A. Protecting the female germ line from cancer therapy. *Nat Med* 2000; 6: 1100-1.
3. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet* 1999; 21: 200-3.
4. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, et al. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 1998; 12: 1304-14.
5. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress *via* ceramide. *Biochem J* 1998; 335: 465-80.
6. Morita Y, Perez GI, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000; 6: 1109-14.
7. Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 341-4.

Remerciements

Nous remercions Jean-François Chatal, Michel Chérel et Isabelle Brisson pour la relecture de ce manuscrit.

François Paris Richard Kolesnick

Laboratory of Signal Transduction,
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,
New York, New York 10021, États-Unis.

Gloria Perez Yutaka Morita Jonathan Tilly

Vincent Center for Reproductive Biology,
Department of Obstetrics and Gynecology,
Massachusetts General Hospital/Harvard
Medical School, Boston, Massachusetts
02114, États-Unis.

Zvi Fuks

Department of Radiation Oncology,
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,
New York, New York 10021, États-Unis.