

## Les mécanismes de l'activation ovocytaire

Céline De Nadai  
Sandrine Chiri  
Brigitte Ciapa

L'activation ovocytaire, qui émane d'un point localisé de l'œuf, fait suite à l'adhérence et à la fusion des deux gamètes et amorce le développement embryonnaire en provoquant le signal calcique indispensable au réveil métabolique de l'œuf. Elle pourrait faire intervenir des ligands spermatiques et des récepteurs ovocytaires (liés aux protéines G, à une activité tyrosine-kinase et PLC $\gamma$ , ou de la famille des intégrines). Cependant, l'interaction entre les membranes des gamètes est court-circuitée lors de l'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) et suggère l'existence de facteur(s) spermatique(s) activateur(s). Parmi eux ont été décrits l'oscilline, une forme tronquée de c-kit (récepteur à activité tyrosine-kinase), un facteur associé au matériel périnucléaire et une phospholipase C. Une autre hypothèse est celle de « la bombe à calcium », selon laquelle le spermatozoïde fusionné permettrait l'entrée de calcium dans l'œuf. Les résultats obtenus chez la souris et chez l'oursin plaident en faveur de l'une et de l'autre de ces hypothèses, peut-être finalement non exclusives.

**L**a fécondation est l'union de gamètes, un ovocyte et un spermatozoïde, chacun apportant un lot de chromosomes, ce qui donne un zygote, cellule totipotente qui se développe en un nouvel individu. Elle implique une succession d'étapes, déjà bien décrites dans un article de synthèse de *médecine/sciences* [1], dont le bon déroulement conduit à l'activation ovocytaire. Le spermatozoïde a subi au préalable un ensemble de modifications morphologiques et biochimiques pour être fécondant. Il a traversé les enveloppes protectrices de l'ovocyte, zone pellucide chez les mammifères ou membrane vitelline chez l'invertébré marin, ce qui a provoqué sa réaction acrosomique. Cette

étape, qui interdit les fécondations croisées, existe également lors de la confrontation du spermatozoïde et de la membrane plasmique de l'ovocyte. A l'adhérence succède la fusion entre les deux gamètes. L'activation ovocytaire fait suite à l'ensemble de ces phénomènes. Il s'agit d'un processus de stimulation cellulaire particulier, capable d'amorcer le développement embryonnaire. En effet, et au contraire de ce que l'on observe pour les cellules somatiques, l'activation de l'œuf émane d'un point localisé à la zone d'interaction entre les deux gamètes, donc d'une fraction extrêmement réduite de la surface de l'œuf. Alors qu'à ce jour de nombreux récepteurs d'hormones ou de facteurs de croissance ont été clonés

### ADRESSES

C. De Nadai: Scientific Institute San Raffaele DIBIT, 58 Via Olgettina, 20 132 Milan, Italie. S. Chiri, B. Ciapa: UMR Cnrs 7622, Université Pierre-et-Marie-Curie, Bâtiment C, boîte 53, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

et les voies d'activation cellulaire qui en découlent bien caractérisées, le schéma d'activation de l'ovocyte est encore loin d'être élucidé.

L'infertilité chez l'homme peut provenir d'une hypofertilité soit masculine, liée à des anomalies de la spermatogenèse, soit féminine, liée à une absence d'ovocytes (anovulation) ou à une production d'ovocytes de mauvaise qualité (dysovulation). Certains cas pourraient également être liés à des défauts de la liaison intergamétique ou de l'activation ovocytaire. L'assistance médicale à la procréation (AMP) permet de contourner ces différents obstacles grâce à un certain nombre de techniques, en particulier la micro-injection du spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*). A cause des difficultés rencontrées dans l'utilisation des ovocytes humains, tant sur le plan éthique que du point de vue technique, la recherche s'est développée grâce à l'emploi de modèles animaux. Nos connaissances proviennent donc de résultats obtenus chez des mammifères tels que la souris ou le hamster, ou des invertébrés tels que l'oursin, l'étoile de mer ou l'ascidie. Certains des résultats obtenus chez l'oursin qui sont exposés plus loin sont extrapolables aux mammifères et *vice versa*.

### Le signal calcique de la fécondation

Il est bien admis qu'un événement ionique joue un rôle-clé dans l'activation de l'ovocyte : l'augmentation rapide et transitoire de la concentration intracellulaire en calcium libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Ce signal calcique existe chez un grand nombre d'espèces, des invertébrés marins (oursin, palourde) aux mammifères (souris, hamster, homme) en passant par les eurocordés (ascidie) et les amphibiens anoures (xénope). Il est indispensable au réveil métabolique de l'œuf, son inhibition par l'injection de chélateurs de calcium entraînant l'arrêt du développement du zygote quelle que soit l'espèce. Toutefois, pratiquement toutes les méthodes d'activation parthénogénétique (traitement par ionophores au calcium, strontium, éthanol, etc.) induisent un signal calcique. La question est donc de savoir quels sont les mécanismes à l'origine

de ce signal, abondamment décrit dans des revues [2, 3].

Chez un grand nombre d'espèces, le signal calcique apparaît sous la forme d'une vague qui se propage dans l'œuf à partir du point d'impact du spermatozoïde. Chez l'oursin, un seul pic calcique apparaît dans la première minute après la fécondation (*figure 1* et [2]). Chez les mammifères (souris, hamster, lapin, bovin, cochon, rat, humain), ce premier pic est suivi pendant plusieurs heures après la fécondation d'oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  espacées par des intervalles de temps réguliers (*figure 1* et [3]). Ces oscillations sont très variables, même au sein d'une espèce donnée, en amplitude, en fréquence et en durée. Par exemple, elles apparaissent toutes les 2 à 4 minutes chez le hamster [4] et toutes les 25 à 50 minutes chez le

bovin [5]. L'utilisation de champs électriques pulsés pour provoquer des augmentations répétées de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les ovocytes de souris ou de lapin a suggéré que l'intensité et la fréquence de ces oscillations influenceraient le taux de réussite de la méiose, la formation du pronucléus et le développement embryonnaire même au-delà du troisième clivage. Ces expériences suggèrent que les ovocytes de mammifère possèdent un système de décodage des signaux calciques en aval des mécanismes de transduction de la fécondation. Une meilleure maîtrise des mécanismes d'activation aboutirait donc à mieux définir les conditions de fécondation *in vitro* [6].

Chez l'échinoderme et le mammifère, cette augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est due à une libération de calcium

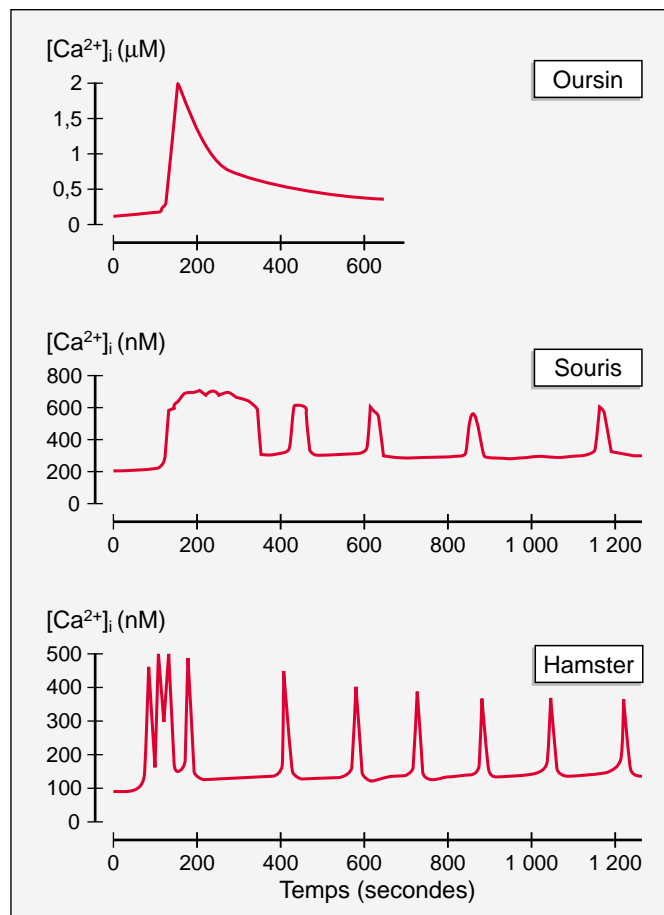


Figure 1. **Signaux calciques après la fécondation chez diverses espèces.** Le temps zéro correspond au premier événement détectable (signal électrique, fusion intergamétique). Après une période de latence plus ou moins longue apparaît un train d'oscillations calciques chez la souris ou le hamster ou un seul pic calcique chez l'oursin. (D'après [8] et [32].)

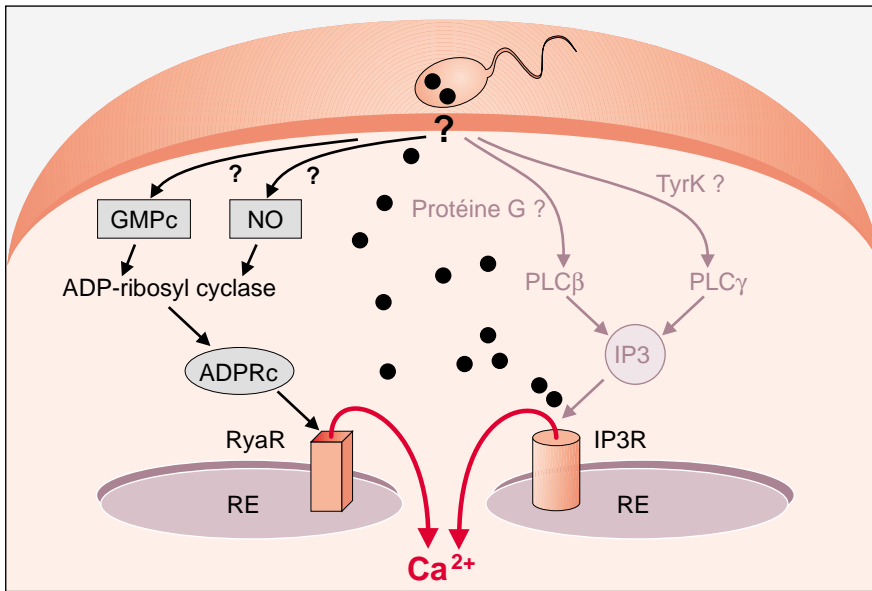


Figure 2. **Les voies à l'origine de la libération de calcium par le réticulum endoplasmique (RE) de l'ovocyte susceptibles d'être stimulées lors de la fécondation.** L'augmentation de monoxyde d'azote (NO) et / ou de GMPc par des voies non encore identifiées conduirait à la stimulation d'ADP-ribosyl cyclase et à la production d'ADPRc, un activateur des récepteurs de la ryanodine (RyaR). La fécondation pourrait également stimuler des voies de signalisation faisant intervenir soit PLCβ soit PLCγ, provoquant la production d'IP<sub>3</sub> et la stimulation des récepteurs IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R). Enfin, un facteur spermatique (symbolisé par des cercles noirs, oscilline par exemple) pourrait diffuser dans l'ovocyte et conduire à l'activation des RyaR et/ou des IP<sub>3</sub>R.

par le réticulum endoplasmique, réserve majeure de calcium mobilisable dans l'ovocyte [2]. Deux types de canaux du réticulum endoplasmique sont susceptibles d'être sollicités au moment de la fécondation : les canaux sensibles à la ryanodine, stimulés par l'adénosine diphosphate ribose cyclique (ADPRc), synthétisée à partir du β-NAD<sup>+</sup> par une ADP-ribosyl cyclase [7], et les canaux sensibles à l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) [8]. Les deux types de récepteurs sont-ils impliqués dans la genèse du signal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de l'œuf fécondé (figure 2)? Chez l'oursin, la situation reste controversée. Certains auteurs ont montré que la micro-injection d'héparine, un inhibiteur des récepteurs IP<sub>3</sub> n'affectant pas les récepteurs de la ryanodine, doit être accompagnée par l'injection de bloqueurs de ces derniers pour une inhibition totale du signal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, alors que d'autres auteurs ne considèrent pas que la synthèse d'ADPRc soit nécessaire pour la genèse de ce signal [2]. Chez le mammifère, la situation diffère en fonction des espèces. Chez l'humain, les deux

types de récepteurs semblent stimulés et deux pools calciques différents permettraient la libération de calcium [9]. En revanche, chez le hamster, l'injection d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'IP<sub>3</sub> suffit à inhiber la vague calcique [4]. De plus, des anticorps dirigés contre le récepteur de la

ryanodine de muscle squelettique ne reconnaissent pas de protéine dans l'ovocyte chez cette espèce [4]. Chez la souris, les récepteurs de la ryanodine, bien que présents et fonctionnels, ne seraient pas sollicités lors de l'activation ovocytaire [10].

L'activation ovocytaire doit donc mettre en jeu l'une ou l'autre des voies conduisant à la synthèse d'ADPRc ou d'IP<sub>3</sub>, ou les deux. La première a été étudiée chez l'oursin, chez lequel le GMPc, produit pendant la période latente [11], et le monoxyde d'azote (NO) stimulent la synthèse d'ADPRc [12]. Cependant, les mécanismes à l'origine de la production de GMPc et de NO restent inconnus. Quant à la production d'IP<sub>3</sub>, elle est déclenchée en même temps que la stimulation du métabolisme des polyphosphoinositides (PPI) chez l'oursin [13] et chez le xénope [14]. L'ensemble des données suggère donc que la voie aboutissant à la production d'IP<sub>3</sub> est toujours sollicitée, quelle que soit l'espèce.

### La reprise du cycle cellulaire de l'ovocyte dormant

La libération de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> est responsable de l'induction de réponses cellulaires nécessaires à la reprise du cycle cellulaire. En effet, l'ovocyte fécondable est bloqué à un stade du cycle cellulaire variable selon les espèces, avant, pendant, ou après la méiose (figure 3). Les ovocytes de mammifères ou de xénope sont, par

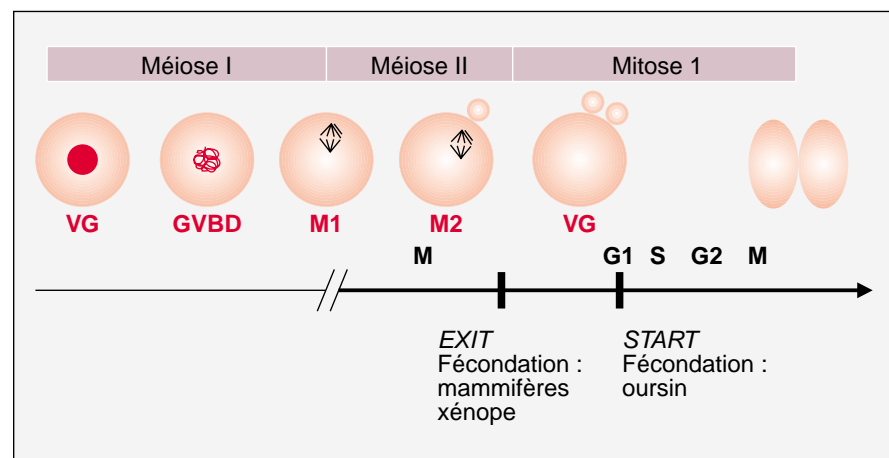


Figure 3. **Les différents points du cycle cellulaire au niveau desquels la fécondation peut avoir lieu chez diverses espèces.** VG : vésicule germinative; GVBD : rupture de la vésicule germinative. (D'après [15].)

exemple, arrêtés en métaphase de seconde division méiotique alors que ceux d'oursin sont bloqués en G<sub>1</sub> après la méiose, prêts à entrer en phase S [15]. Chez toutes les espèces, les premières divisions mitotiques se succèdent rapidement, alternant phases de synthèse d'ADN et de mitose quasiment sans interphases G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub> [15]. Le contexte moléculaire dans lequel se trouve l'ovocyte lors de la fécondation n'est donc pas identique selon l'espèce considérée. Chez le mammifère et le xénope, les activités de MAP kinases (*mitogen activated protein kinase*) et du MPF (*mitosis promoting factor*) sont élevées, ce qui maintient les ovocytes en métaphase II de méiose [15, 16]. Des interactions entre les oscillations calciques de la fécondation et le MPF ont été suggérées. Un nombre suffisant de pics calciques conduirait à l'activation d'une Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase II puis à l'inactivation du MPF, permettant à l'ovocyte fécondé d'entrer en interphase [17], et/ou à la dégradation de facteurs protéiques responsables de l'arrêt en métaphase dont le niveau diminuerait avec l'âge des ovocytes. Cela expliquerait qu'une augmentation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induite lors d'une activation parthénogénétique soit capable d'activer l'ovocyte de plus en plus efficacement au fur et à mesure qu'il vieillit (discuté dans [3]). Chez l'oursin, l'œuf non fécondé contient au contraire une activité MPF faible et une activité MAP kinase non négligeable [17]. Il semble donc que le dénominateur commun soit une diminution de l'activité MAP kinase lors de l'activation ovocytaire après la fécondation, en tout cas chez les mammifères [15], le xénope [15], l'oursin [18] et l'étoile de mer [19].

Après le signal calcique, l'activation ovocytaire entraîne aussi des changements de la perméabilité membranaire aux ions et à différents solutés, ainsi que la stimulation de la synthèse de protéines kinases et de phosphatases [15, 20]. Ces mêmes processus sont activés dans des cellules somatiques en réponse à un stimulus externe, ligand soluble ou lié à la matrice extracellulaire, *stress*, etc. [21, 22]. La reprise du cycle cellulaire de l'œuf fécondé pourrait passer par des voies d'acti-

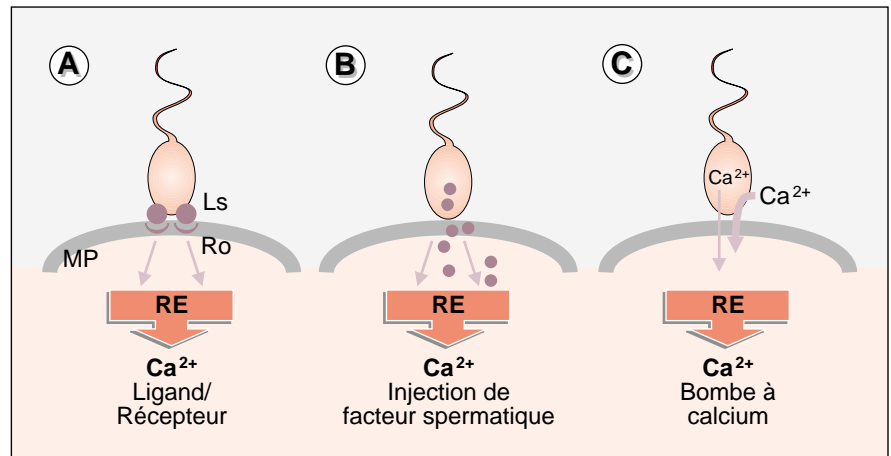


Figure 4. **Trois mécanismes susceptibles d'entraîner l'activation de l'œuf après libération de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> à partir du réticulum endoplasmique (RE).** A. Des ligands contenus dans la membrane plasmique du spermatozoïde (Ls) reconnaîtraient des récepteurs (Ro) de la membrane plasmique de l'ovocyte (MP) à l'origine de voie(s) d'activation cellulaire. B. Le spermatozoïde contiendrait un facteur qui diffuserait dans le cytoplasme de l'ovocyte après fusion des gamètes. C. Hypothèse de la pompe à calcium.

vation identiques à celles des cellules somatiques, des protéines spermatiques stimulant des récepteurs spécifiques de la membrane de l'ovocyte (figure 4 et [1]). Selon une autre hypothèse, appelée « hypothèse de la pompe à calcium », le spermatozoïde fusionné permettrait le transfert de calcium vers les réserves intracellulaires de l'œuf [23]. Un autre modèle propose, enfin, l'existence d'un ou de plusieurs facteur(s) spermatique(s) qui induirai(en)t l'activation de l'ovocyte une fois injecté(s) (figure 4 et [3]). L'analyse de divers modèles expérimentaux montre que des arguments sont en faveur ou non de chacune de ces hypothèses, lesquelles ne sont d'ailleurs peut-être pas exclusives.

### Fusion intergamétique et période latente

Le premier événement détecté après la fécondation est la fusion entre les gamètes. Chez l'oursin, une augmentation de la capacitance – et donc de la surface de la membrane ovocytaire – a été mesurée, correspondant à la mise en continuité des membranes des gamètes [24]. Chez la souris, l'utilisation d'indicateurs fluorescents a montré qu'il y a toujours fusion des gamètes avant le signal cal-

cique [25, 26]. Chez l'oursin, il se passe 7 secondes à une demi-minute entre la fusion et le début de la libération de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. C'est la « période latente ». La fusion s'effectuerait en deux temps, d'abord réversible puis permanente à la fin de la période latente [27]. Chez le mammifère, la durée de cette période diffère selon les espèces, de 10 secondes chez le hamster [8] à plus d'une minute chez la souris [25] voire à plusieurs minutes lors d'une fécondation hétérologue spermatozoïde de souris/ovocyte de hamster [8].

L'œuf ne peut donc pas être simplement activé par l'action d'un ligand spermatique sur un récepteur ovocytaire, puisqu'il ne peut y avoir d'activation de l'ovocyte sans fusion préalable [25]. La fusion du spermatozoïde et de l'œuf permettrait donc la diffusion dans l'œuf d'un facteur activateur pendant la période latente [27]. Cependant, cette période pourrait représenter le temps nécessaire au recrutement de plusieurs récepteurs au sein d'un complexe capable d'engendrer un signal. Dans tous les cas, l'existence de cette période implique que la concentration ovocytaire d'un facteur spermatique ou d'un second messager intracellulaire induit par l'activation d'un récepteur atteigne un seuil pour déclencher le signal calcique.



## Mise en jeu d'un récepteur membranaire

La recherche de molécules spermatiques susceptibles de se lier à l'ovocyte a abouti à la caractérisation de certaines protéines. Nous citerons chez l'oursin la *bindin*, abondamment décrite [28] et, chez le mammifère, des protéines régulatrices du complément telles que DAF (*decay activating factor*) ou MCP (*membrane cofactor protein*), des constituants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et, enfin, la fertiline, dont la caractérisation est exposée plus en détail ci-dessous [1].

### Récepteur-protéines G/PLC $\beta$ ou récepteur-tyrosine kinase/PLC $\gamma$ ?

Nous avons mentionné le fait qu'une activité PLC (phospholipase C) est stimulée rapidement après fécondation. Plusieurs familles de PLC ont été répertoriées [29]. Parmi elles, les PLC $\beta$  répondent aux récepteurs associés à des protéines G et les PLC $\gamma$  le plus souvent à des voies à activité tyrosine kinase. Pour être activée, PLC $\gamma$  doit le plus souvent être phosphorylée sur tyrosine et se lier à des résidus phosphorylés sur tyrosine par ses deux domaines SH2 (*src homology domain*). L'augmentation rapide de la phosphorylation sur tyrosine de certaines protéines chez le xénope [30], la souris ou l'oursin [31] a donc orienté le travail de plusieurs équipes, dont la nôtre, vers cette isoforme. Chez l'oursin, l'inhibition compétitive des domaines SH2 de PLC $\gamma$ , par injection d'une protéine de fusion contenant ces domaines de PLC $\gamma$  bovine, abolit le signal calcique [32]. Ces résultats sont donc plutôt en faveur d'une seule voie faisant intervenir PLC $\gamma$  dans la genèse du signal calcique chez l'invertébré marin.

Chez la souris, PLC $\beta$ 3, PLC $\gamma$ 1 et PLC $\gamma$ 2 ont été détectées dans les ovocytes [33, 35]. Les mêmes expériences que celles décrites ci-dessus ont été effectuées mais la micro-injection des domaines SH2 de PLC $\gamma$  ne provoque pas d'inhibition du signal calcique [34]. Cela suggère que l'activation de PLC $\gamma$  n'est pas nécessaire pour la libération de  $[Ca^{2+}]_i$  lors de la fécondation chez cette espèce, à moins que PLC $\gamma$  ne soit stimulée par un mécanisme alternatif. La disponibilité du

substrat, les phosphatidylinositol bisphosphate (PIP $_2$ ) et le cytosquelette d'actine sont par exemple capables de régler l'activité de PLC $\gamma$  [29]. Enfin, des zygotes PLC $\gamma$ <sup>-/-</sup> [36] ou PLC $\beta$ 3<sup>-/-</sup> [35] peuvent être formés mais leur développement précoce est aboli. Même si le nombre d'embryons homozygotes obtenus dans ces expériences est très faible, ces résultats suggèrent que ces protéines ne sont pas indispensables à l'activation de l'œuf de souris après la fécondation.

D'autres résultats favoriseraient l'hypothèse d'un récepteur associé à des protéines G chez certaines espèces. En effet, chez l'oursin [13] comme chez la souris [4], l'activation ovocytaire peut être induite par la micro-injection de GTP $\gamma$ S, un analogue non métabolisable du GTP. Cependant, alors que le GDP $\beta$ S, un bloqueur des protéines G, inhibe totalement les signaux calciques chez le hamster [4], il n'inhibe pas le signal calcique de la fécondation chez l'oursin [27]. Les protéines G de la famille G $_q$  ne semblent pas non plus impliquées lors de la fécondation chez la souris, chez laquelle différentes protéines G (G $_{os}$ , G $_{oi}$  1-3, G $_{oo}$ ) ont pourtant été identifiées [37].

La stimulation de PLC $\gamma$  a également été observée à la suite de l'activation de

récepteurs associés à des protéines G. De plus, outre les récepteurs de tyrosine kinase, des récepteurs aussi divers que les intégrines ou le TCR (*T cell receptor*) induisent l'activation de PLC $\gamma$  [29]. La voie conduisant à l'activation de PLC $\gamma$  n'est donc peut-être ni unique, ni unidirectionnelle. Enfin, aucune molécule spermatique susceptible d'être un ligand de récepteur associé à des protéines G ou de récepteur à activité tyrosine kinase n'a été identifiée.

### Fertiline/intégrines

La recherche d'intégrines à la surface ovocytaire provient de la découverte de ligands de ces molécules à la surface des spermatozoïdes de mammifère (*figure 5*). La fibronectine est présente, par exemple, sur la plaque équatoriale qui est la zone de fusion avec l'œuf, et son expression est acquise lors du passage des gamètes dans l'épididyme. La vitronectine est aussi synthétisée par les spermatozoïdes humains lors de leur maturation, puis sécrétée lors de la réaction acrosomique [1]. Plus récemment, on a caractérisé, à la surface des spermatozoïdes de cochon d'Inde, une glycoprotéine susceptible de participer à la fusion des gamètes, appelée PH30 puis renommée fertiline. Elle a

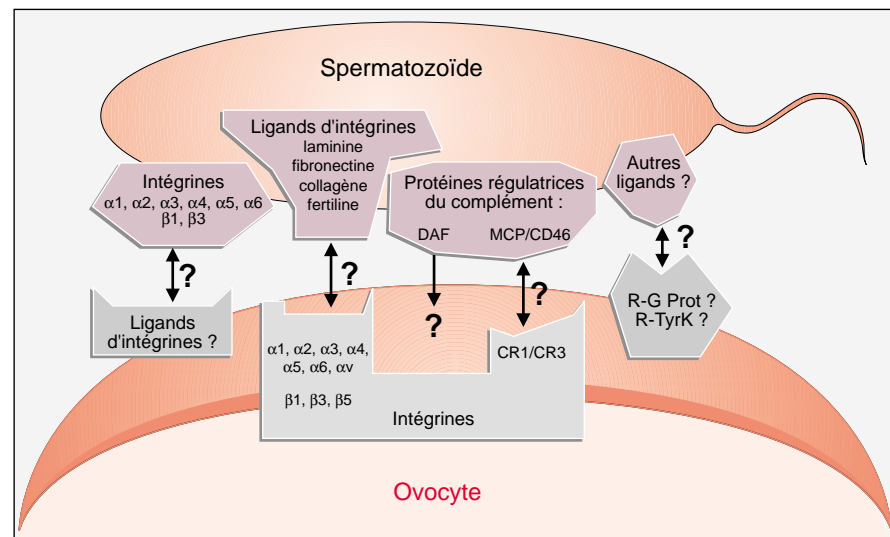


Figure 5. **Représentation schématique de la variété des interactions possibles entre le spermatozoïde et l'ovocyte.** Des molécules spermatiques (intégrines, ligands d'intégrines, protéines régulatrices du complément ou autres molécules) sont susceptibles de se comporter comme des ligands de molécules réceptrices contenues dans la membrane plasmique de l'ovocyte (ligands d'intégrines, intégrines, récepteurs associés à des protéines G ou à activité tyrosine kinase).

ensuite été clonée chez le cobaye, la souris, le macaque et l'homme [1]. Sa découverte a permis d'identifier la famille des protéines ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain*) [38]. La fertiline est composée de deux sous-unités transmembranaires,  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  contient un domaine disintégrine pouvant se lier à une intégrine à la surface de l'ovocyte; la sous-unité  $\alpha$  possède dans sa partie extracellulaire un motif hélicoïdal retrouvé dans des protéines de fusion virales qui permettrait aux membranes des gamètes de fusionner [1]. Si le rôle de la fertiline  $\alpha$  dans la fusion des gamètes humains a été remis en question [1], celui de la fertiline  $\beta$  reste d'actualité. En particulier, l'adhérence et la fusion sont altérées lors de fécondations effectuées avec des spermatozoïdes de souris dont le gène a été invalidé, n'exprimant pas la fertiline  $\beta$ , alors que l'activation ovocytaire n'est pas inhibée dans ces conditions [39].

Les intégrines sont des glycoprotéines à deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$  [40]. Diverses intégrines ont été mises en évidence dans des ovocytes de nombreuses espèces et pourraient intervenir dans l'adhérence/fusion des gamètes et l'activation ovocytaire. Cette hypothèse est étayée par le fait que des peptides RGD ou QDE, qui reproduisent des motifs de liaison des intégrines, inhibent la fécondation chez le mammifère [1]. Nous avons observé que l'incubation d'ovocytes de hamster dépourvus de membrane pellucide avec des anticorps anti- $\alpha 2$  et anti- $\alpha 5$  inhibe significativement l'attachement et la fusion de spermatozoïdes humains à ces ovocytes, alors que des anticorps anti- $\alpha 4$  n'inhibent que la fusion [41]. Certaines chaînes d'intégrines seraient donc impliquées dans l'adhérence et la fusion des gamètes et d'autres interviendraient uniquement lors de la fusion. Il a aussi été proposé que seule  $\alpha 6 \beta 1$  était reconnue par la fertiline. Cependant, alors que plusieurs résultats étayaient le rôle de la chaîne  $\beta 1$ , l'implication de la chaîne  $\alpha 6$  semble moins essentielle [42].

L'activation d'intégrines permet la transduction du signal *via* des tyrosine kinases ou des enzymes du métabolisme des PPI telles que PLC $\gamma$  ou PI 3-kinase, qui sont aussi sollicitées lors de

la fécondation comme nous l'avons vu plus haut. Elles peuvent donc induire un signal calcique. Les intégrines s'associent également à des protéines du cytosquelette telles que taline, vinculine et  $\alpha$ -actinine, par lesquelles peut transiter un signal activateur [40]. Ces protéines ont été détectées dans des ovocytes de souris et de hamster. Chez l'oursin, nous avons observé que la taline et l' $\alpha$ -actinine, mais non la vinculine, s'associent après fécondation à des protéines phosphorylées sur tyrosine [41]. Les intégrines pourraient donc participer au réveil du métabolisme de l'œuf en induisant la phosphorylation de protéines associées au cytosquelette.

### La micro-injection d'un facteur spermatique

L'ICSI permet l'incorporation du spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte et entraîne l'activation du zygote ainsi formé. Cette méthode connaît un succès croissant depuis la première tentative de Palermo *et al.* en 1992 [43] effectuée chez l'humain malgré un succès limité chez d'autres mammifères [44]. L'expérimentation s'est ensuite développée chez ces derniers avec plus de succès [44] et les résultats ont permis une meilleure compréhension du processus d'activation ovocytaire induit par l'ICSI.

Le fait que l'interaction membranaire spermatozoïde/ovocyte soit court-circuitée pendant l'ICSI conforte l'idée que l'activation de l'ovocyte serait due à l'injection d'un (ou de plusieurs) facteur(s) spermatique(s) possédant les propriétés d'un oscillateur calcique. Cette hypothèse a été émise pour la première fois par B. Dale *et al.* en 1985 [45] qui avaient montré que la micro-injection d'extraits spermatiques provoque la réaction corticale d'œufs d'oursin. Depuis, un grand nombre de résultats ont été publiés, suggérant que des extraits spermatiques obtenus chez diverses espèces sont capables d'activer les ovocytes [46]. Ces extraits spermatiques ne sont pas spécifiques de l'espèce, puisqu'ils peuvent provoquer la libération de calcium dans les ovocytes de souris, de hamster, d'homme ou d'oursin [46]. Cependant, personne à notre connaissance n'a pu reproduire les

résultats obtenus par B. Dale chez l'oursin.

### L'oscilline

En 1990, l'équipe de K. Swann montrait que la micro-injection d'un extrait spermatique dans un ovocyte de hamster provoque des oscillations calciques semblables à celles de la fécondation *in vitro*, puis purifiait et clonait en 1996 un facteur protéique de 33 kDa appelé oscilline [46]. L'oscilline présente 53% d'homologie de séquence avec une glucosamine-6-phosphate désaminase (GNPDA) d'*E. coli*. Elle est localisée dans le cytoplasme au niveau de la plaque équatoriale des spermatozoïdes. L'oscilline se lierait à un composant présent dans l'ovocyte, formant un complexe capable d'activer à la fois les canaux ryanodine et les canaux IP $_3$  par un mécanisme indépendant de l'ADPRc et de l'IP $_3$  [47]. L'oscilline a été aujourd'hui clairement disqualifiée par divers auteurs [48] et même K. Swann en fait à présent un contaminant des fractions spermatiques obtenues après purification [46].

### tr-kit

En 1997, il était rapporté que l'injection dans des ovocytes de souris d'une forme tronquée de c-kit (tr-kit), un récepteur à activité tyrosine kinase apparenté au récepteur de PDGF, peut déclencher l'activation ovocytaire [49]. Cette protéine de 24 kDa correspond à la partie carboxy-terminale et intracellulaire de c-kit, et contient toujours son domaine catalytique et le domaine de liaison de PLC $\gamma$ . L'injection d'une forme recombinante de tr-kit induit l'activation d'ovocytes de souris, avec reprise du cycle cellulaire, inhibition de l'activité MAP kinase, expulsion du second globe polaire et exocytose des granules corticaux [49], mimant ainsi la fécondation. Les mêmes auteurs ont ensuite montré que tr-kit doit se lier à la PLC $\gamma$  pour activer les ovocytes [49]. L'hypothèse d'un rôle de tr-kit dans l'activation de l'ovocyte nécessite cependant d'être étayée. tr-kit n'est ainsi que faiblement exprimé sur la zone équatoriale des spermatozoïdes de souris et l'est plutôt dans la pièce intermédiaire du flagelle, qui est toutefois phagocytée par l'ovocyte [49].

De plus, il n'est pas sûr que l'injection de tr-kit induise les mêmes oscillations calciques que la fécondation.

### Les autres candidats

La chasse à l'activateur ovocytaire n'a jamais été plus ouverte. Les extraits spermatisques de porc contiendraient un facteur différent de l'oscilline, de poids moléculaire entre 29 et 68 kDa [50]. Jones *et al.* ont suggéré que l'oscilligène serait une PLC spermatique sur la base d'expériences impliquant l'action d'extraits spermatisques de ver rat sur des homogénats d'ovocytes d'oursin [51]. Il est clair, cependant, que ce type d'expérience ne reflète pas la situation physiologique. Le spermatozoïde pourrait aussi contenir plusieurs facteurs activateurs. Chez la souris, le facteur spermatique serait insoluble, associé au matériel périmembranaire et agirait de façon coordonnée avec un ou plusieurs autres constituants de la membrane du spermatozoïde [52].

### L'hypothèse de la « bombe à calcium »

Dans cette hypothèse, proposée par L.F. Jaffe il y a une vingtaine d'années, le spermatozoïde fusionné permettrait le transit de calcium vers le réticulum endoplasmique de l'œuf dont la concentration calcique atteindrait un seuil permettant la « détonation » de la vague calcique [23]. Le calcium pourrait provenir du spermatozoïde, mais il n'est pas sûr que celui-ci en contienne suffisamment pour activer l'œuf, même si la  $[Ca^{2+}]_i$  du spermatozoïde est augmentée lors de sa réaction acrosomique à la suite de l'ouverture de canaux calciques [53]. Le calcium pourrait également provenir du milieu extracellulaire. Dans ce cas, la fécondation peut-elle s'effectuer dans un milieu extracellulaire ne contenant pas de calcium ? Les résultats concernant l'invertébré marin sont contradictoires, les conditions expérimentales laissant planer le doute quant à la  $[Ca^{2+}]$  effectivement présente dans le milieu extracellulaire [23]. Chez la souris, l'apparition des signaux calciques est inhibée [25] ou non [26] dans un milieu extracellulaire dépourvu de calcium. La démonstration de la présence obligatoire de calcium extracellulaire pour la fécondation ne suffira pas pour valider le

modèle de L.F. Jaffe. En effet, le calcium pourrait être impliqué dans les premières étapes de la fécondation, en réglant des molécules telles que les cadhérines qui ne sont fonctionnelles qu'en présence de calcium et pourraient participer à l'adhérence et/ou la fusion des gamètes [40].

### Conclusions

Il est difficile de proposer une synthèse de toutes ces hypothèses. Néanmoins, celle qui nous paraît la plus plausible est la mise en route par le spermatozoïde de plusieurs voies d'activation cellulaire synergiques impliquant un ou plusieurs récepteur(s) voire un ou plusieurs facteur(s) spermatique(s). Bien qu'aucun activateur dérivé du spermatozoïde ne soit encore clairement identifié, cette possibilité reste intéressante, même si les résultats doivent être interprétés avec vigilance. Toute substance contenue dans le spermatozoïde et nécessaire à la réaction acrosomique, qui utilise le métabolisme des PPI et le calcium, peut entraîner la libération de calcium après injection dans l'ovocyte ou ajout à des extraits ovocytaires. L'hypothèse selon laquelle plusieurs voies ou facteurs agissent en parallèle corrobore certains résultats obtenus après ICSI. En effet, l'ICSI ne mime pas toujours la fécondation, ce qui suggère que le signal  $[Ca^{2+}]_i$  induit par le spermatozoïde injecté est soumis à régulation. En particulier, le signal  $[Ca^{2+}]_i$  après ICSI ne se présente pas sous la forme d'une vague mais plutôt d'une augmentation de calcium dans l'ensemble de l'ovocyte chez la souris, et ses caractéristiques dépendent de la technique d'injection chez l'humain [48]. Enfin, il ne faut pas occulter le fait que lors d'une fécondation normale, le spermatozoïde doit fusionner avec l'ovocyte avant d'injecter des facteurs activateurs potentiels. Même si le rôle de récepteurs ne se limitait qu'à cette étape, il resterait essentiel.

Un complexe plurimoléculaire est souvent proposé dans les fibroblastes ou dans les cellules immunitaires [40]. Les intégrines pourraient être associées directement ou indirectement à des tyrosine kinases [40] ou fonctionner dans les ovocytes comme des co-récepteurs en agissant en synchronie avec d'autres récepteurs, associés à des protéines G ou à activité tyrosine kinase, comme c'est le cas dans les

lymphocytes T. La co-stimulation de plusieurs récepteurs pourrait ainsi induire l'adhérence, la fusion, la stimulation du métabolisme de l'ovocyte et l'endocytose du spermatozoïde. Un tel schéma expliquerait pourquoi les inhibitions de fécondation hétérologue hamster/humain en présence d'anticorps anti-intégrines sont toujours partielles [41].

Enfin, chez l'oursin, l'activation de PLC $\gamma$  semble essentielle au démarrage de la vague calcique de l'œuf. L'activation de PLC $\gamma$  pourrait être due à la stimulation simultanée de voies différentes. En effet, la stimulation de cette enzyme implique non seulement sa phosphorylation sur tyrosine et son accrochage par ses domaines SH2 à des résidus phosphorylés sur tyrosine, mais également la reconnaissance de sites riches en proline (contenus dans les protéines du cytosquelette) par son domaine SH3 et de phospholipides variés par son domaine PH (*pleckstrin homology*) [29]. L'étude de l'activation ovocytaire s'inscrit dans un contexte scientifique et médical qui dépasse largement son propre objet. La découverte de la fertiline a été, par exemple, à l'origine de la mise en évidence de la famille des molécules ADAM, impliquées dans des processus de fusion cellulaire, de neurogenèse ou d'extension axonale [38]. Ce sont aussi les études réalisées sur l'activation ovocytaire qui ont fourni les premières évidences d'un rôle important du changement de  $[Ca^{2+}]_i$  dans la régulation de la prolifération cellulaire. L'étude de la fécondation a également permis d'identifier de nouveaux mécanismes à l'origine de signaux calciques, et c'est dans l'œuf d'oursin qu'a été découvert puis caractérisé l'ADPRc [7]. Enfin, l'étude de la maturation, de la fécondation et de l'activation ovocytaire a contribué de façon très importante à notre connaissance du MPF, protéine ubiquitaire contrôlant le cycle cellulaire [15, 16, 21]. Des résultats dans ce domaine pourraient donc

### Remerciements

Les auteurs remercient M. Moreau de la lecture critique du manuscrit et les arbitres anonymes de *médecine/sciences* pour leurs remarques constructives. Les travaux de recherche sont soutenus par le Cnrs, l'Inserm et le ministère de l'Environnement (contrat N° EN 97C09). C. De Nadai est boursière ARC.



encore conduire à l'identification de nouveaux mécanismes intervenant lors d'interactions cellulaires, de la phagocytose, ou même de la fusion virale ■

## RÉFÉRENCES

1. Finaz C, Ruiz CM, Lefevre A. Interaction des gamètes et protéines de reconnaissance. *Med Sci* 1998; 14: 175-82.
2. Shen SS. Mechanisms of calcium regulation in sea urchin eggs and their activities during fertilization. *Curr Top Dev Biol* 1995; 30: 63-101.
3. Jones KT.  $Ca^{2+}$  oscillations in the activation of the egg and development of the embryo in mammals. *Int J Dev Biol* 1998; 42: 1-10.
4. Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $Ca^{2+}$  release channel in  $Ca^{2+}$  waves and  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; 158: 62-78.
5. Fissore RA, Dobrinski JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM. Patterns of intracellular  $Ca^{2+}$  concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 1992; 47: 960-9.
6. Ozil JP. Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach. *Biophys Chem* 1998; 72: 141-52.
7. Galione A, White A.  $Ca$  release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 431-6.
8. Miyazaki S. Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 190-6.
9. Sousa M, Barros A, Tesarik J. The role of ryanodine-sensitive  $Ca^{2+}$  stores in the  $Ca^{2+}$ -oscillation machine of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 265-72.
10. Ayabe T, Kopf G, Schultz RM. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uniseminated and inseminated eggs. *Development* 1995; 121: 2233-44.
11. Ciapa B, Epel D. An early increase in cGMP follows fertilization of sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 633-6.
12. Willmott N, Sethi JK, Walseth TF, Lee HC, White AM, Galione A. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem* 1996; 271: 3699-705.
13. Lee SJ, Shen S. The calcium transient in sea urchin eggs during fertilization requires the production of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Dev Biol* 1998; 193: 195-208.
14. Snow P, Yim DL, Leibow JD, Saini S, Nuccitelli R. Fertilization stimulates an increase in inositol trisphosphate and inositol lipid levels in *Xenopus* eggs. *Dev Biol* 1996; 180: 108-18.
15. Sagata N. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 22-8.
16. Cormier P, Mulner-Lorillon, Morales J, Poulhe R, Ballé R. Phosphorylation et synthèse protéique au cours de la méiose de l'ovocyte. *Med Sci* 1992; 8: 673-8.
17. Dupont G. Link between fertilization-induced  $Ca^{2+}$  oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation. *Biophys Chem* 1998; 72: 153-67.
18. Chiri S, De Nadai C, Ciapa B. Evidence for MAP kinase activation during mitotic division. *J Cell Sci* 1998; 111: 2519-27.
19. Abrieu A, Fisher D, Simon MN, Dorée M, Picard A. MAPK inactivation is required for the G2 to M-phase transition of the first mitotic cell cycle. *EMBO J* 1997; 16: 6407-13.
20. Epel D. Activation of sperm and egg during fertilization. In: Hoffman JF, Jamieson JJ, eds. *Handbook of physiology: cell physiology*. New York: Oxford Press, 1997: 859-84.
21. Waskiewicz AJ, Cooper JA. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 798-805.
22. Malarkey K, Belham C, Paul A, et al. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 1995; 309: 361-75.
23. Jaffe LF. The roles of intermembrane calcium in polarizing and activating eggs. In: Dale B, ed. *Mechanisms of fertilization*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1990: 389-417.
24. McCulloh DH, Chambers EL. Fusion of membranes during fertilization. *J Gen Physiol* 1992; 99: 137-75.
25. Lawrence Y, Whitaker M, Swann K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial  $Ca^{2+}$  increase at fertilization in the mouse. *Development* 1997; 124: 233-41.
26. Jones KT, Soeller C, Cannel MB. The passage of  $Ca^{2+}$  and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 1998; 125: 4627-35.
27. Whitaker M, Swann K, Crossley I. What happens during latent period at fertilization? In: Nuccitelli R, Cherr GN, Clark WH, eds. *Mechanism of eggs activation*. New York: Plenum Press, 1989: 157-71.
28. Lopez A, Miraglia SJ, Glabe CG. Structure/function analysis of the sea urchin sperm adhesive protein bindin. *Dev Biol* 1993; 156: 24-33.
29. Rhee SG, Bae YS. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Bio Chem* 1997; 272: 15045-8.
30. Sato K, Iwasaki T, Tamaki I, Aoto M, Tokmakov AA, Fukami Y. Involvement of protein-tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in sperm-induced *Xenopus* egg activation. *FEBS Lett* 1998; 424: 113-8.
31. Kinsey WH. Tyrosine kinase signaling at fertilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240: 519-22.
32. Shearer J, De Nadai C, Fenouil F, Gache C, Whitaker M, Ciapa B. Role of phospholipase Cg at fertilization of sea urchin eggs. *Development* 1999; 126: 2273-84.
33. Dupont G, McGuinness OM, Johnson MH, Berridge MJ, Borgese F. Phospholipase C in mouse oocytes: characterization of  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms and their possible involvement in sperm-induced  $Ca^{2+}$  spiking. *Biochem J* 1996; 316: 583-91.
34. Mehlmann LM, Carpenter G, Rhee SG, Jaffe LA. SH2 domain-mediated activation of phospholipase C $\gamma$  is not required to initiate  $Ca$  release at fertilization of mouse eggs. *Dev Biol* 1998; 203: 221-32.
35. Wang S, Gebre-Medhin S, Betsholtz C, et al. Targeted disruption of the mouse PLC $\beta$ 3 gene results in early embryonic lethality. *FEBS Lett* 1998; 441: 261-5.
36. Ji Q, Winnier GE, Niswender KD, et al. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C $\gamma$ 1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2999-3003.
37. Williams CJ, Mehlmann LM, Jaffe LA, Kopf GS, Schultz RM. Evidence that Gq family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev Biol* 1998; 98: 116-27.
38. Bigler D, Chen M, Waters S, White J. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 220-5.
39. Cho C, O' Dell Bunch D, Faure JE, et al. Fertilization defects in sperm from lacking fertilin  $\beta$ . *Science* 1998; 281: 1857-9.
40. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 197-263.
41. De Nadai C, Fenichel P, Donzeau M, Epel D, Ciapa B. Characterization and role of integrins during gametic interaction and egg activation. *Zygote* 1996; 4: 31-40.
42. Evans JP, Schultz RM, Kopf G. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin  $\beta$  subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg  $\beta$ 1 integrin-mediated interaction. *Dev Biol* 1997; 187: 79-93.
43. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
44. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995; 52: 709-20.
45. Dale B, De Felice LJ, Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm extract into sea urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia* 1985; 41: 1068-70.
46. Swann K, Parrington J, Jones KT. On the search for the sperm oscillogen. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1010-2.
47. Galione A, Jones KT, Lai FA, Swann K. A cytosolic sperm protein factor mobilizes  $Ca^{2+}$  from intracellular stores by activating multiple  $Ca^{2+}$  release mechanisms independently of low molecular weight messengers. *J Biol Chem* 1997; 272: 28901-5.
48. Fissore RA, Reis MM, Palermo GD. Sperm-induced calcium oscillations. Isolation of the  $Ca^{2+}$  releasing component(s) of mammalian sperm extracts: the search continues. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 189-92.
49. Sette C, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. Involvement of phospholipase C $\gamma$ 1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the C-kit tyrosine present in spermatozoa. *J Cell Biol* 1998; 142: 1063-74.
50. Wu H, He CL, Jehn B, Black SJ, Fissore RA. Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev Biol* 1998; 203: 369-81.



## RÉFÉRENCES

51. Jones, KT, Cruttwell C, Parrington J, Swann K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol triphosphate and causes  $Ca^{2+}$  release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett* 1998; 437: 297-300.
52. Perry AC, Wakayama T, Yanagimachi R. A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol Reprod* 1999; 60: 747-55.
53. Suarez SS, Dai X. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster sperm. *Mol Reprod Dev* 1998; 42: 325-33.

## TIRÉS À PART

B. Ciapa.

## Summary

### Mechanisms of egg activation after fertilization

Fertilization results in a series of well-coordinated events, including specific recognition between species, adhesion and fusion between gametes, that finally leads to egg activation. In most deuterostomes, a transient rise in intracellular free calcium occurs during egg activation and is necessary for early embryonic development. In the light of recent data obtained in various biological models, from invertebrates to mammals, we discuss how this « calcium signal » is generated from the point of sperm/egg interaction. Different hypotheses have been proposed to explain egg activation. The sperm may bind to a receptor on the egg plasma membrane, linked to G-pro-

teins, tyrosine kinase and PLC $\gamma$ , or belonging to the integrins family. Another possibility is that an activating sperm factor enters the egg after fusion establishes cytoplasmic continuity. Among the putative factors isolated from sperm extracts have been: oscillin, a truncated form of c-kit (a receptor with tyrosine-kinase activity), an unidentified factor associated to the perinuclear material, and a phospholipase C. Finally, in the « bomb calcium hypothesis », the sperm would allow the transit of calcium from the external medium into the egg once it has fused with the egg. Results argue for or against each model, which may not be exclusive.

## COMMENT VALORISER LES RECHERCHES ET DÉVELOPPER UN PROJET INNOVANT AVEC L'INDUSTRIE ?

Un diplôme d'Université de Génie Biologique et Médical est organisé au sein de la Faculté Saint-Antoine et de l'Université Paris VI, pour répondre à cette question.

Cette formation se propose d'enseigner : la protection des recherches (prise de brevet...), la valorisation de la recherche appliquée, les règles de l'innovation et de l'évaluation biomédicale. Les possibilités de financement privé des recherches, les modes de contrats entre chercheurs et industriels, les procédures réglementaires européennes qui obligent à modifier certains choix pour le déroulement des recherches, le choix du meilleur partenaire industriel, les contraintes mais aussi les avantages à innover et à évaluer des produits nouveaux en collaboration avec les industriels, les enjeux de la thérapie génique et de la télémédecine, le partenariat entre universités et écoles technologiques, ingénieurs et médecins nécessaires à la recherche appliquée biomédicale, seront enseignés de façon pratique (visites d'industries GBM, nombreux exemples concrets, dialogue avec les conférenciers, rencontres avec les industriels susceptibles de développer des innovations...). Les aspects juridiques (loi pour la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, les structures adéquates pour développer l'innovation) ainsi que l'informatique médicale et la télémédecine seront abordés. Enfin, les carrières offertes par des industriels de santé et les structures juridiques pour innover seront envisagées.

L'enseignement se clôturera par un « jeu de rôle » qui simulera à partir de cas concrets, les stratégies de veille technologique et de transfert d'innovations.

L'autre originalité de cette formation est un télé-enseignement par visioconférences avec le Canada et Strasbourg.

Cet enseignement organisé par le Professeur Alain Sezeur avec l'aide du Docteur Jean-Pierre Thierry s'adresse aux professionnels de santé soucieux de trouver des partenaires pour développer des innovations biomédicales (Dates : Session I : 17, 18, 19 janvier 2000 ; Session II : 26, 27, 28 janvier 2000 ; Session III : 15, 16 mars 2000 et Session IV : 17, 18 mars 2000)

Le rôle des incubateurs et des pépinières d'entreprises comme moteur pour la recherche sera également traité.

### RENSEIGNEMENTS ET INSCRIPTIONS :

S'adresser au secrétariat du Professeur Alain Sezeur, Hôpital Rothschild  
33, boulevard de Picpus, 75012 PARIS, France. Tél. : 01 40 19 36 46. Site internet : [www.ccr.jussieu.fr/gbm](http://www.ccr.jussieu.fr/gbm). E-mail : [dominique.flanquart@rth.ap-hop-paris.fr](mailto:dominique.flanquart@rth.ap-hop-paris.fr)  
Possibilités de restauration et d'hébergement à proximité du lieu des cours.