

LES CONSTITUANTS AMINÉS DES SÉCRÉTIONS TUBAIRES CHEZ LA LAPINE

ZYMOGRAMME — PROTÉINES — ACIDES AMINÉS LIBRES

Y. MENEZO et P. LAVIOLETTE

avec la collaboration de Ch. KHATCHADOURIAN et J. GUILLAUD

*Laboratoire de Biologie, I. N. R. A.,
Institut national des Sciences appliquées,
69 100 Villeurbanne*

RÉSUMÉ

Les sécrétions tubaires, recueillies en continu au cours du cycle sexuel, ont été étudiées chez la lapine pour trois composants :

- les protéines enzymatiques ou non,
- les acides aminés libres.

Le zymogramme tubaire a été comparé à ceux du sérum et du liquide séminal. Il comporte des estérases, des phosphatases, des aminopeptidases et de l'amylase. Les activités des enzymes tubaires sont généralement plus faibles que celles de leurs homologues sériques.

Les activités estérasiques et phosphatasiques de l'oviducte semblent croître au moment de l'ovulation et au cours des trois jours suivants.

Le liquide séminal se distingue par une plus grande richesse en osidases plus ou moins complexes, mais ne possède pas d'amylase.

L'albumine, la transferrine et l'Ig_A ont été détectées dans les liquides tubaires.

Les sécrétions de l'oviducte se présentent au point de vue acides aminés et composés apparentés comme un milieu complexe, qualitativement et quantitativement assez voisin du sérum. La glycine est présente à un taux important dans les deux fluides.

L'alanine, la glycine et l'acide glutamique augmentent significativement après l'ovulation les 3^e et 4^e jours *post* HCG. D'autre part il semble que les sécrétions de l'oviducte possèdent une certaine originalité vis-à-vis du sérum, certains composés présents dans l'oviducte ne se retrouvant pas dans le sérum.

INTRODUCTION

Si les premières observations relatives aux fluides de l'oviducte remontent au XIX^e siècle, (WOKRESSENSKY, 1891), ce n'est qu'en 1956 que BISHOP a vraiment commencé de manière systématique l'étude de ces sécrétions.

Elles constituent en effet un milieu de transition satisfaisant à la fois aux exigences des spermatozoïdes et à celles de l'ovule, gamètes évoluant à l'origine dans deux milieux fort différents : le liquide séminal et le liquide folliculaire.

Nous avons tenté d'analyser certaines des modifications qui peuvent intervenir au moment de l'ovulation et les échanges susceptibles de se réaliser entre l'œuf et son milieu.

Deux paramètres seront étudiés dans ce travail :

- les protéines, y compris les protéines enzymatiques ;
- les acides aminés libres.

1° Le problème des activités enzymatiques a été abordé sous l'angle histo-chimique par GREENWALD (1969) et FREDRICSSON (1969) : des phosphatases et estérases diverses ont été mises en évidence.

Dans les liquides tubaires, quelques enzymes ont été détectées :

- une activité phosphatasique capable de dégrader la glycéryl-phosphoryl-choline (WHITE et WALLACE, 1961) ;
- une activité amylasique (Mc GEACHIN *et al.*, 1958) ;
- une activité anhydrase carbonique (LUTWAK-MANN, 1955) ;
- une activité glycy - et alanyl-aminopeptidasique (ALBEERS *et al.*, 1961).

Il nous a paru intéressant d'étudier également le zymogramme sérique par la même méthode semi-quantitative afin d'essayer de définir d'éventuelles analogies avec le zymogramme tubaire.

Nous avons analysé d'autre part, à titre de comparaison, le zymogramme du liquide séminal. En effet, les enzymes présentes au sein de l'oviducte et absentes du liquide séminal pourraient éventuellement jouer un rôle dans le processus de capacitation.

2° L'analyse des acides aminés tubaires a été réalisée par GREGOIRE et coll. (1961), MASTROIANNI et WALLACH (1961) chez la Lapine et par PERKINS et GOODE (1967) chez la Brebis. Cependant le problème des besoins en acides aminés libres de l'œuf tubaire pour son développement normal suscite encore bien des controverses.

Par le biais des cultures, DANIEL et coll. (1963, 1967 et 1968) concluent à la nécessité d'introduire dans les milieux de culture certains acides aminés indispensables, selon eux, à la réalisation de la segmentation de l'œuf et à la croissance du jeune blastocyste.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de MAUER (1968) et ceux de BRINSTER (1970), pour qui une source azotée protéique telle que l'albumine de l'œuf, serait suffisante pour le développement de l'embryon du stade 2 blastomères au stade morula. Enfin, selon GREENWALD (1959) chez la Souris et MANES et DANIER (1969) chez la Lapine, l'œuf durant son transit tubaire n'incorporerait que peu ou pas d'acides aminés libres.

I. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

La technique, préalablement décrite (MENEZO, 1971) de cathétérisation en continu de l'oviducte au cours du cycle sexuel est basée sur celle de CLEWE et MASTROIANNI (1960) et HOLMDAHL et MASTROIANNI (1965).

Les volumes liquides recueillis sont de l'ordre de 1 ml par jour. Les variations de volumes observées sont du même ordre de grandeur que celles de MASTROIANNI et WALLACH (1961).

Les animaux (femelles *Néo-Zélandaises* adultes, nullipares, pesant de 3,5 à 4 kg) reçoivent une injection IM de 75 UI de PMSG induisant l'œstrus (LUTWAK-MANN et MC INTOSH, 1969) suivie trois jours plus tard d'une injection IV de 75 UI d'HCG : l'ovulation intervient 10 à 12 heures plus tard et ce traitement provoque la ponte de 8 à 16 ovules.

Les prises de sang sont réalisées au niveau de la veine marginale de l'oreille.

1. — Étude des zymogrammes

Le dispositif employé a été imaginé par BUISSIÈRE (1967) en vue de l'étude de l'équipement enzymatique des microorganismes et adapté à celle des zymogrammes tissulaires par PLANTEVIN, NARDON, LAVIOLETTE (1968) et NARDON et PLANTEVIN (1970).

Les sécrétions tubaires, le sérum ou le liquide séminal placés en solution tampon convenable sont incubés en présence d'un substrat chromogène dans un réservoir capillaire de plastique. Une feuille de papier-filtre spécial est placée entre les deux feuilles de plastique dont l'une est transparente. Les capillaires sont délimités par emboutissage à chaud. Après quelques heures d'incubation à 37°C le résultat de la réaction enzymatique est estimé à l'œil nu par lecture de la coloration observée.

La liste des substrats et les réactifs de coloration employés figurent dans le tableau 1.

En ce qui concerne l'activité amyliase la technique de BELANGER et coll. (1970) a été employée.

Les sécrétions tubaires ont été analysées systématiquement au cours du cycle sexuel. Sept lapines ont été testées pendant onze jours avant et après ovulation.

Les sérums étudiés proviennent de seize lapins (huit mâles et huit femelles).

Le liquide séminal a été recueilli à partir de quatre mâles.

2. — Protéines non enzymatiques

La méthode de DAVIS et coll. (1964) a été employée pour les électrophorèses sur gel.

Les immunoelectrophorèses ont été réalisées selon GRABAR et COURÇON (1958).

3. — Acides aminés libres

Les analyses sont réalisées sur Autoanalyseur Technicon selon la méthode de SPACKMAN STEIN et MOORE (1958) modifiée par M. EFRON (1965).

Il s'agit de la technique de submicroanalyse de ROBIN et coll. (1967) : colonne de 140 cm de long, 3 mm de diamètre interne, garnie de résine Chromobeads Technicon type B. La programmation de température de colonne employée est celle de BONNOT et coll. (1970). Les chromatogrammes sont dépouillés et intégrés selon la méthode de TEMPE (1966).

La technique de défécation des sécrétions tubaires correspond à des modifications de celle décrite par STEIN et MOORE (1954) et utilisée par O'BRIEN (1963). Pour le plasma la précipitation des protéines a été réalisée selon la méthode de PAWLAK et PRON (1968).

a) *Sécrétions tubaires* : 300 µl de sécrétion sont lyophilisés avec 125 nanomoles de norleucine (standard interne). Le lyophilisat est repris avec 200 µl d'acide sulfosalicycique 3 p. 100 + 50 ml de glycérine. L'échantillon est ensuite filtré sur millipore 0,22µ. 100 µl du filtrat sont injectés en haut de colonne.

La reproductibilité de la méthode est d'environ 5 p. 100 sauf pour la lysine et l'arginine (15 p. 100). L'extraction de la cystine à l'acide sulfosalicycique a un rendement médiocre.

D'autre part, la sérine, l'asparagine et la glutamine ne sont pas séparées et sont éluées par notre technique, sous forme d'un seul pic.

b) *Plasma* : trois prises de sang sont effectuées sur chaque animal. La première le jour de l'injection de P.M.S. (témoin repos sexuel), la seconde le jour de l'injection d'H.C.G. (œstrus), la troisième, trois jours post H.C.G.

Le sang, aussitôt prélevé, est recueilli sur anticoagulant à la température de la glace fondante, puis centrifugé.

400 µl de plasma + 125 nanomoles de norleucine sont utilisés. La défécation et l'extraction des acides aminés est réalisée à l'alcool 82° selon PAWLAK et PRON (1968).

c) *Analyse statistique* : les résultats ont été testés suivant la méthode de l'analyse de variance à un facteur contrôlé.

TABLEAU I
Activités enzymatiques révélées par la méthode Ausotab dans les sécrétions tubaires, le sérum et le liquide séminal
 0 : activité nulle 2 : activité moyenne
 ? : activité douteuse 3 : activité forte
 1 : activité faible

Enzymes	Substrats utilisés	Composés libérés	Réactifs de révélation		Sécrétions tubaires	Sérum	Liquide séminal
			Diazo bleu	Soude			
0 Phosphatase alcaline	Phénolphthaléine diphosphate	Phénolphthaléine		X	2	2	2
1 Phosphatase non spécifique	β -naphtyl phosphate	β -naphhtol	X	X	3	3	3
2 Estérase acétate	β -naphtyl acétate	β -naphhtol	X		3	3	3
3 Estérase butyrate	β -naphtyl butyrate	β -naphhtol	X		2	3	2
4 Lipase nonanoate	β -naphtyl nonanoate	β -naphhtol	X		1	3	2
5 Galactosidase	Orthonitrophényl galactopyranoside (ONPG)	Orthonitrophénol	jaune sp.		0	0	1
6 Aminopeptidase alanyl	DL-alanyl β -naphtylamide	β -naphtylamide	X		1	2	2
7 Aminopeptidase leucyl	L-leucyl β -naphtylamide	β -naphtylamide	X		1	1	2
8 Aminopeptidase valine	Valine β -naphtylamide	β -naphtylamide	X		?	1	0
9 Trypsine	N-benzoyl DL-arginine β -naphtylamide	β -naphtylamide	X		0	?	0
10 Chymotrypsine	N-benzoyl DL-phénylalanine β -naphtylamide	β -naphtylamide	X X		1	1	0
11 Phosphatase acide	Phénolphthaléine diphosphate	Phénolphthaléine		X	1	2	2
12 Glucosaminidase	Naphтол ASBI N acétyl β D-glucosaminide	Naphтол ASBI	X	X	0	0	1
13 Glucuronidase (1)	Naphтол AS glucuronide	Naphтол AS	X	X	0	0	1
14 Glucosidase	6-Bromo 2-Naphтол β -glucopyranoside	6-Bromo 2-Naphhtol	X	X	0	0	1
α -Amylase	Amidon			Iode	1	1	0

(1) Cette enzyme est parfois présente dans le sérum et les sécrétions tubaires de certains animaux.
 X indique l'addition, après l'incubation, du composé désigné en haut de colonne.

Pour les acides aminés dont l'analyse de variance est positive, nous avons procédé à des comparaisons de moyennes deux à deux, après avoir testé les variances de ces moyennes. Pour un acide aminé donné variant significativement, la moyenne correspondant à un certain état endocrinien a donc été comparée à toutes les autres.

II. — RÉSULTATS

I. — *Zymogramme*

Les résultats sont rassemblés sur le tableau 1.

Sécrétions tubaires.

Toutes les activités testées se sont révélées positives à l'exception de la trypsine et des enzymes des sucres 12 à 14, peut-être à cause de la sensibilité insuffisante de la méthode. Les activités sont en général assez faibles sauf pour les estérases et les phosphatases.

Les intensités semblent, pour ces dernières, augmenter au moment de l'ovulation et pendant les trois jours suivants.

Sérum.

Les enzymes des sucres 12 à 14 semblent également absentes. La trypsine, dont la présence a déjà été décrite, n'a pu être clairement mise en évidence, la sensibilité de notre méthode pour cette enzyme étant vraisemblablement trop faible.

Liquide séminal.

Les enzymes des sucres à l'exception de l'amylase sont présentes. Il est à noter cependant que les aminopeptidases sont moins bien représentées que dans le sérum et les sécrétions tubaires.

2. — *Protéines* (fig. 1)

La teneur en protéines des sécrétions tubaires est beaucoup plus faible que celle du sérum. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence l'hémoglobine (comparaison avec le sérum hémolysé).

Cependant, grâce à la confirmation apportée par les colorations spécifiques, nous pouvons notamment mettre en évidence :

- l'albumine ;
- la transferrine (β_1 -glycoprotéine) ;
- l'IgA (β_2 -glycoprotéine).

Il est important de noter qu'il existe une très grande différence de concentration entre les deux liquides pour les composantes protéiques ayant une migration électrophorétique de type γ -globulines.

Cependant, même après concentration, nous n'avons jamais pu obtenir la confirmation directe par immunoelectrophorèse de la présence de γ -globulines au niveau de l'oviducte.

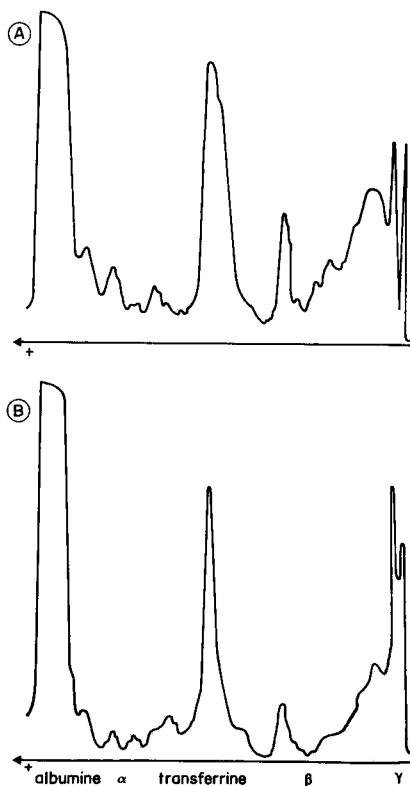


FIG. 1. — Protéinogrammes sérique et tubaire (coloration amido-Schwartz-620 nm)

- A. Sérum à 2 p. 100 d'hémolyse. Les deux pics hémoglobine et transferrine sont confondus.
 B. Sécrétion tubaire concentrée vingt fois (Diaflo). Noter l'absence d'hémoglobine et la différence au niveau des γ -globulines.

3. — Acides aminés libres

a) Sécrétions tubaires.

Identification : dans le tableau 2 figurent tous les acides aminés détectés, dosés ou simplement identifiés.

17 acides aminés sur les 20 principaux ont pu être dosés au cours du cycle sexuel. Le tryptophane et les différents produits d'oxydation des acides aminés soufrés : acide cystéique, méthionine sulfoxyde et sulfone, ont été mis en évidence.

Tous les composés du cycle de l'urée : citrulline, ornithine, arginine, urée sont présents.

Quelques autres acides aminés ou composés apparentés ont pu être détectés : acide γ -aminobutyrique, 1-méthyl-histidine, carnosine, β -alanine, taurine et éthanolamine.

Dosages quantitatifs (tabl. 2).

La glycine est l'acide aminé le plus abondant. Les taux de sérine, alanine, acide glutamique, sont également importants. Cependant, si les acides aminés ramifiés sont bien représentés, les basiques, les soufrés et la proline sont présents en quantités limitées.

Comme MASTROIANNI *et al.* (1961) nous avons pu constater qu'il existe une variabilité importante d'un animal à l'autre pour un acide aminé donné. Cependant, si la plupart des acides aminés semblent augmenter légèrement après ovulation, seuls varient significativement l'alanine, la glycine et l'acide glutamique.

— *glycine* : au moment de l'ovulation le taux de glycine est significativement plus faible que celui du témoin. Les taux des 3^e, 4^e et 5^e jours après l'injection d'HCG sont significativement supérieurs à la valeur de ce même témoin.

— *acide glutamique* : les taux des 3^e et 4^e jours post HCG sont significativement supérieurs au témoin.

— *alanine* : l'augmentation des 3^e et 4^e jours *post* HCG est significative par rapport au témoin.

L'ensemble asparagine-glutamine-sérine augmente significativement 3, 4, 5 jours *post* HCG.

TABLEAU 3

Dosage des acides aminés libres dans le plasma
(μ moles/100 ml)

Acide aminé	Traitement hormonal					
	Témoin		3 j <i>post</i> PMS		3 j <i>post</i> HCG	
	Plasma	S.T.	Plasma	S.T.	Plasma	S.T.
Acide aspartique ...	2,88	3,94	1,68	2,81	2,46	3,74
Thréonine	13,13	8,22	8,43	6,07	12,28	8,73
Sérine $\left\{ \begin{array}{l} + \text{Glu NH}_2 \\ + \text{Asp NH}_2 \end{array} \right\}$	67,25	39,51*	46,02	32,19*	69,91	45,31*
Acide glutamique ..	7,95	16,39	8,45	13,32	9,10	25,91
Proline	44,47	+	36,87	3,51	32,52	10,36
Citrulline	5,36	1,84	5,41	1,10	7,19	2,16
Glycine	140,55	315,5	127,42	280,6	142,38	575,1
Alanine	56,58	46,77	36,47	40,01	42,51	68,97
Valine	19,42	12,39	15,62	11,40	20,79	14,64
Cystine	5,19	2,62	7,71	1,30	7,75	2,88
Méthionine	2,92	2,96	2,37	2,20	2,92	3,63
Isoleucine	7,66	5,56	5,89	3,71	7,33	4,93
Leucine	9,61	9,00	7,98	6,53	10,79	9,12
Tyrosine	9,08	5,69	8,21	5,27	9,15	8,28
Phénylalanine	5,22	5,52	4,53	4,17	5,14	7,55
Ornithine	11,58	3,07	11,04	4,62	11,75	8,33
Lysine	14,50	8,64	16,55	6,70	18,18	7,35
Histidine	10,73	6,47	10,35	3,86	11,09	5,66
Arginine	16,58	6,57	19,04	3,67	20,34	4,01
Taurine	15,69	4,98	14,11	6,59	7,86	8,58
Urée	+	+	+	+	+	+

* Pour le plasma, les résultats correspondent à la sérine seule.

b) *Plasma* (tabl. 3 et 4).

Les taux et les proportions relatives des différents acides aminés sont assez voisins dans le plasma et dans les fluides tubaires.

L'analyse de variance permet de conclure, dans le cadre de notre étude (nombre de répétitions) qu'il ne se produit pas de variations significatives au niveau du plasma pendant le cycle sexuel, aux dates que nous avons choisies.

TABLEAU 4

Comparaison de la teneur en acides aminés libres du plasma et des sécrétions tubaires (μmoles/100 ml)

Acide aminé	Témoin	Traitement hormonal		Moyenne globale	
		3 j <i>post</i> PMS	3 j <i>post</i> HCG		(¹)
Acide aspartique . . .	2,88	1,68	2,46	2,16	4,99
Thréonine	13,13	8,43	12,28	11,12	13,90
Sérine seule	67,25	46,02	69,91	58,70	42,35
Acide glutamique . .	7,95	8,45	9,10	8,55	15,45
Proline	44,47	36,87	32,52	37,36	37,35
Citrulline	5,36	5,41	7,19	6,04	7,63
Glycine	140,55	127,42	142,38	136,5	172,05
Alanine	56,58	36,47	42,51	44,43	49,44
Valine	19,42	15,62	20,79	18,54	22,42
Cystine	5,19	7,71	7,75	7,04	1,74
Méthionine	2,92	2,37	2,92	2,68	5,03
Isoleucine	7,66	5,89	7,33	6,85	8,95
Leucine	9,61	7,98	10,79	9,45	11,55
Tyrosine	9,08	8,21	9,15	8,79	9,05
Phénylalanine	5,22	4,53	5,14	4,95	6,85
Ornithine	11,58	11,04	11,75	11,44	14,89
Lysine	14,50	16,55	18,18	16,59	25,90
Histidine	10,73	10,35	11,09	10,73	13,79
Arginine	16,58	19,04	20,34	18,84	22,57
Taurine	15,69	14,11	7,86	12,26	7,80
Urée	+	+	+	non dosé	45,66

(¹) Résultats selon GODFRAIN et coll. (sérum).

Nos résultats, en accord avec ceux de GODFRAIN *et al.* (1969), compte tenu des variations observées selon la technique d'extraction (éthanol ou acide sulfosalicilique), font apparaître les points suivants :

— la glycine est toujours présente à un taux nettement plus important dans le liquide de l'oviducte ;

— les acides aminés basiques (surtout lysine et arginine) sont en concentration plus importante dans le plasma. La proline et la citrulline obéissent à la même règle ;

- la β -alanine n'a pu être détectée dans le plasma ;
- nous n'avons pu mettre en évidence de façon claire la présence d'éthanolamine dans le plasma. GODFRAIN *et al.* ne l'ont pas détecté non plus, mais ont, par contre, signalé la présence d'hydroxyproline.

III. — DISCUSSION

I. — *Zymogrammes*

Les zymogrammes sériques et tubaires sont sensiblement identiques, cependant les activités du sérum sont généralement plus intenses. Nous n'avons pas observé de différence entre les zymogrammes sériques des mâles et ceux des femelles.

On peut donc admettre l'hypothèse selon laquelle les enzymes proviendraient pour partie d'un transit à partir du système circulatoire au travers des cellules de l'épithélium tubaire.

Les activités enzymatiques détectées semblent pouvoir assumer un rôle intéressant lors du processus de fécondation et au cours des premiers stades de l'ontogénèse.

Rôle dans le processus de capacitation.

Il semble que seule l'amylase, parmi les enzymes testées, puisse intervenir dans la capacitation. Ceci serait d'ailleurs pour partie en accord avec KIRTON et HAFS (1965).

Rôle nutritionnel.

Les estérases et les phosphatases peuvent être en mesure de fournir de l'énergie et des métabolites assimilables tant aux spermatozoïdes (WHITE et WALLACE, 1961) qu'à l'œuf fécondé, par hydrolyse de composés tubaires.

Les aminopeptidases pourraient jouer un rôle analogue.

Rôle dans le « nettoyage » du tractus.

Selon JOSHI (1970), une enzyme de type leucyl- et alanyl-aminopeptidase serait responsable de la décapitation des spermatozoïdes chez le Rat. Il est à noter que des enzymes de ce type sont présentes et pourraient intervenir de la même façon dans l'oviducte.

Il est intéressant de noter la présence d'une lipase dans les trois fluides. Le rôle de cette enzyme dans le liquide séminal et dans les fluides tubaires est pour l'instant difficile à interpréter.

2. — *Les protéines*

Nous n'avons jamais pu mettre en évidence toutes les composantes sériques dans les sécrétions tubaires même après concentration (MENEZO, 1971). Nos résultats sont en accord avec ceux de SHAPIRO *et al.* (1971).

Les protéines présentes en quantité plus importante dans les liquides tubaires sont l'albumine et la transferrine, donc des composantes de poids moléculaire moyen. D'autre part, nous n'avons jamais pu mettre en évidence les γ -globulines, mais de faibles quantités de β 2A-globulines dont le poids moléculaire est moins important. Il semblerait donc exister, si l'on retient pour partie l'hypothèse d'un transfert à partir du système vasculaire, une sélection au niveau de la paroi tubaire, sélection qui pourrait se faire en fonction du poids moléculaire.

Les réactions antigènes-anticorps de faible intensité, observables dans l'oviducte (GLASS, 1969; BEHRMAN, 1969; ACKERMAN et GONZALES-ENDERS, 1969) seraient vraisemblablement dues aux IgA.

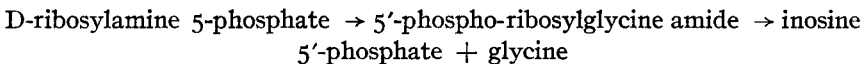
3. — Acides aminés libres

a) Sécrétions tubaires.

Elles se présentent sous la forme d'un milieu très riche et il semble que des relations métaboliques de type nutritionnel puissent exister entre l'œuf et ce milieu.

Tous les acides aminés décrits par DANIEL et coll. (1963, 1967, 1968) comme nécessaires au développement de l'œuf pendant ses premiers stades sont présents dans les fluides tubaires.

Il est d'autre part intéressant de noter, comme l'avaient fait PERKINS et GOODE (1967) chez la Brebis et GREGOIRE *et al.* (1961) chez le Lapin que la glycine est prépondérante au niveau de l'oviducte. En effet, les milieux à base de glycine peuvent être employés pour la dilution et la conservation des spermatozoïdes en vue de l'insémination artificielle. D'autre part, elle peut être incorporée directement dans la chaîne de biosynthèse du matériel nucléaire (bases pures) selon le processus suivant :



En ce qui concerne les variations quantitatives des acides aminés, l'augmentation significative observée pour certains AA correspond dans le temps à l'apparition de la blastokinine de KRISHNAN et DANIEL (1967-1968) dans l'utérus (URZUA *et al.*, 1970).

Il est probable que ces deux phénomènes, l'un observable au niveau de l'oviducte, l'autre au niveau de l'utérus, dépendent du même régulateur hormonal : les œstrogènes, ou du rapport $\frac{\text{œstrogènes}}{\text{progestérogène et dérivés}}$.

Dans cette hypothèse, nos résultats seraient en partie comparables à ceux de GREGOIRE *et al.* (1961).

Cependant, comme le volume de fluides tubaires diminue à partir du 3^e jour suivant le déclenchement de l'ovulation, l'augmentation du taux des acides aminés est modulée par cette diminution de volume.

Les « mouvements d'eau » joueraient ainsi un rôle important : la quantité d'acides aminés restant sensiblement constante, seule la concentration varie.

Enfin, il semble que l'augmentation observée pour le liquide tubaire ne puisse

guère se révéler pleinement efficace pour l'œuf, celui-ci passant en effet de l'oviducte dans l'utérus au moment où intervient cette variation.

b) *Relations plasma-sécrétions tubaires.*

Les concentrations sont, pour la plupart des acides aminés, du même ordre de grandeur. Un transit sélectif à travers la paroi de l'oviducte n'est donc pas à exclure, ce qui expliquerait que certains acides aminés sont plus (glycine) ou moins bien (proline) représentés dans les sécrétions tubaires que dans le plasma. Cependant la participation active de l'épithélium est vraisemblable : la β -alanine et l'éthanolamine observables seulement au niveau de l'oviducte ne peuvent sans doute provenir que d'un processus de synthèse ou de dégradation proprement tubaire, vraisemblablement au niveau de l'épithélium.

CONCLUSIONS

L'étude comparée des sécrétions tubaires et du plasma (ou sérum) conduit à penser que le liquide tubaire pourrait tirer son origine d'un double processus : une perméabilité à travers la paroi laissant passer les composés sériques, et une biosynthèse propre au niveau des cellules sécrétrices. La paroi tubaire semblerait pouvoir jouer le rôle de membrane de dialyse en ce qui concerne les petites molécules et les molécules protéiques d'un poids moléculaire peu élevé (enzymes, globulines). Les γ -globulines, au contraire, franchiraient mal la paroi à cause de leur dimension moléculaire. Les différences de concentrations observées pour certains composés résulteraient de modifications du processus de « dialyse » et de l'évolution de la biosynthèse au niveau des cellules sécrétrices. L'analyse des conditions précises qui régissent ce double phénomène implique la mise en œuvre de techniques complémentaires diverses, histochimie et étude ultrastructurale de l'épithélium tubaire d'une part, utilisation de molécules marquées dont le transit éventuel pourrait être suivi, d'autre part.

Sur un plan pratique enfin, il semble que le sérum dialysé puisse servir de base chez certaines espèces à la constitution d'un milieu de culture des œufs de l'organisme homologue, bien que le liquide folliculaire, que nous n'avons pas étudié, puisse jouer également un rôle important.

Reçu pour publication en février 1972.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. C. THIBault qui fut à l'origine de ce travail et dont les conseils éclairés nous furent précieux.

SUMMARY

THE AMINO CONSTITUENTS OF TUBAL SECRETIONS IN THE RABBIT
(ZYMOGRAM-PROTEINS-FREE AMINO-ACIDS)

Three components of the tubal secretions of the doe-rabbit are continuously collected during the sexual cycle :

- enzymatic or non-enzymatic proteins
- free amino acids

The tubal zymogram is compared to that of the serum and the seminal liquid. It includes esterases, phosphatases, amino-peptidases, and amylase. Tubal enzyme activities are usually less than those of their seric homologues.

Esterasic and phosphatasic oviduct activities seem to increase at ovulation time and during the three following days.

Seminal liquid does not have amylase but is distinguished by more osidases of a somewhat complex nature.

Albumin, transferrin, and Ig_A are detected in tubal fluids.

Oviduct secretions seem to be a complex medium from the viewpoint of amino acids and related compositions, and qualitatively and quantitatively rather similar to serum. There is a high amount of glycine in both fluids.

Alanine, glycine, and glutamic acid increase significantly after ovulation the 3rd and 4th post-HCG days. Moreover, oviduct secretions seem to be somewhat different than serum since some compositions present in the oviduct are not found in serum.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACKERMAN D. R., GONZALES-ENDERS R., 1969. Metabolism of Rabbit spermatozoa in homologous immune serum and oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, **1**, 407-410.
- ALBEERS H. J., BEDFORD J. M., CHANG M. C., 1961. Uterine peptidase activity within the rat and rabbit tracts during pseudo-gestation. *Am. J. Physiol.*, **201**, 554.
- AUSTIN C. R., 1963. In *The Mammalian egg*, Blackwell, Oxford, 183.
- BEHRMAN S. J., 1969. Immunology of oviductal secretions. In *The Mammalian oviduct* de E. S. E. HAFEZ et R. J. BLANDAU, 357. Chicago University Press.
- BELANGER A., PERREAULT J., COUTURE Y., DUNNIGAN J., 1970. Determination of pancreatic amylase activity by a radial diffusion essay. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **48**, 758-761.
- BISHOP D. W., 1956. Active secretion in the rabbit oviduct. *Am. J. Physiol.*, **187**, 347.
- BONNOT G., DELOBEL B., 1970. Détermination des paramètres d'identification et de dosage par chromatographie d'échange d'ions de 61 acides aminés et composés apparentés. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **10** (3), 357.
- BRINSTER R. L., 1970. Culture of two cell rabbit embryo to morulae. *J. Reprod. Fert.*, **21**, 17-22.
- BUISSIÈRE J., FOURCARD A., COLOBERT L., 1967. Usage de substrats synthétiques pour l'étude de l'équipement enzymatique de microorganismes. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **265**, 979.
- CLEWE T. H., MASTROIANNI L. Jr, 1960. A method for continuous volumetric collection of oviduct secretion. *J. Reprod. Fert.*, **1**, 146-150.
- DANIEL J. C., 1963. Cleavage of rabbit ova in protein free media. *Am. Zool.*, **3**, 526.
- DANIEL J. C., OLSON J. D., 1968. Amino acid requirements for cleavage of rabbit ovum. *J. Reprod. Fert.*, **15**, 453-455.
- DAVIS B. J., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- EFRON M. L., 1965. Quantitative estimation of aminoacids in physiological fluids using a Technicon Analyzer, p. 637 in *Automation in analytical chemistry*, Technicon symposium, New York.
- FREDRICSSON B., 1959. Studies on the morphology and histochemistry of the Fallopian tube epithelium. *Acta Anat., Suppl.*, **37**.
- GLASS L. E., 1969. Immunological studies of the mouse oviduct. In *The Mammalian oviduct*, ed. E. S. E. HAFEZ et R. J. BLANDAU, Chicago University Press, p. 459.

- GODFRAIN J.-C., RICO A. G., LORGUE G., BURGAT-SACAZE V., DESAQUI-SANNES P., 1969. Détermination des acides aminés libres du sérum de lapin domestique par chromatographie sur résines échangeuses d'ions. *Communication aux Journées sur le lapin*. I. N. R. A., Maisons-Alfort, 1969.
- GRABAR P., COURÇON P., 1958. Étude des sérums de Cheval, Lapin, Rat et Souris par l'analyse immunoelectrophorétique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1995-2003.
- GREENWALD G. S., EVERETT N. B., 1959. The incorporation of 35 S-methionine by the uterus and ova of the mouse. *Anat. Record*, **134** 171.
- GREENWALD G. S., 1969. Endocrinology of Oviduct Secretions. In *The Mammalian oviduct*, ed. E. S. E. HAFEZ et R. J. BLANDAU, Chicago University Press, p. 183.
- GREGOIRE A. T., GONGSAKDI D., RAKOFF A. E., 1961. The free amino acid content of the female rabbit genital tract. *Fertil. Steril.*, **5**, 587-595.
- HOLMDAHL T. H., MASTROIANNI L. JR, 1965. Continuous collection of rabbit secretions at law temperature. *Fertil. Steril.*, **5**, 587-595.
- JOSHI M. S., YARON A., LINDNER H. R., 1970. An endopeptidase in the uterine secretion of the proestrous rat and its relation to a sperm decapitating factor. *Biochem. Biophys. Res. communic.*, U. S. A., **38**, 52.
- KIRTON K. T., HAFS M. D., 1965. Sperm capacitation by uterine fluid or amylase *in vitro*. *Science*, **150**, 618-619.
- KRISHNAN R. S., DANIEL J. D., 1967. « Blastokinine » inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science*, **158**, 4907.
- KRISHNAN R. S., DANIEL J. D., 1968. Composition of « blastokinine » from rabbit uterus. *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 579.
- LUTWAK-MANN C., 1955. Carbonic anhydrase in the female reproductive tract: occurrence, distribution and hormonal dependence. *J. Endocr.*, **13**, 26.
- LUTWAK-MANN C., MCINTOSH J. E. A., 1969. Zn and carbonic anhydrase in the rabbit uterus. *Nature* **221**, 1111-1114.
- MC GEACHIN R. L., HARGAN L. A., POTTER B. A., DAUS A. T., 1958. Amylase in fallopian tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**, 130.
- MANES C., DANIEL J. C., 1969. Quantitative and qualitative aspects of protein synthesis in the preimplantation rabbit embryo. *Exp. Cell Res.*, **55**, 261-268.
- MASTROIANNI L. JR, WALLACH R. C., 1961. Effect of ovulation and early gestation on oviduct secretions in the rabbit. *Am. J. Physiol.*, **200**, 815-818.
- MAUER R. E., HAFEZ E. S. E., EHLERS M. M., KING J. R., 1968. Culture of two cell rabbit eggs in chemically defined media. *Exp. Cell Res.*, **52**, 293-300.
- MENEZO Y., 1971. *Contribution à l'étude des sécrétions tubaires. Pression osmotique, zymogramme, protéines, acides aminés libres*. Thèse 3^e cycle n° 38, Fac. Sci., Lyon.
- NARDON P., PLANTEVIN G., 1970. Utilisation d'une microméthode (Auxotab) pour la recherche qualitative d'activités enzymatiques dans les tissus d'insectes : hémolymphe. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **271**, 2137-2140.
- O'BRIEN D., BUTTERFIELD L. J., 1963. Further studies on renal conservation of free amino acids in early infancy. *Arch. Dis. Childh.*, **38**, 437.
- PAWLAK M., PION R., 1968. Influence de la supplémentation des protéines du blé par des doses croissantes de lysine sur la teneur en acides aminés libres du sang et du muscle du rat en croissance. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 517.
- PERKINS J. L., GOODE L., 1968. Free amino acids in the oviduct fluid of the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **14**, 309.
- PLANTEVIN G., NARDON P., LAVIOLETTE P., 1967. Évolution de l'activité enzymatique du mésentéron de larves de *Galleria mellonella* en culture. *IInd Intern. Coll. Invertebrate Tissue Culture*. Trezezzo.
- ROBIN P., ROBIN D., JACQUOT R., 1967. Submicrodetermination des amino-acides p 1-7 in *Colloque sur la chromatographie*, Technicon, Paris.
- SHAPIRO S. S., JENTSCH J. P., YARD A. S., 1971. Protein composition of rabbit oviductal fluids. *J. Reprod. Fert.*, **24**, 407-408.
- SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the Chromatography of amino-acids. *Anal. Chem.*, **32**, 1190-1206.
- STEIN W. M., MOORE S., 1954. The free amino acids of human blood plasma. *J. Biol. Chem.*, **211**, 915.
- TEMPE J., 1966. Analyse des acides aminés L. Considérations générales sur l'intégration des pics. Une méthode rapide d'intégration manuelle. *J. Chromatog.*, **24**, 169.
- URZUA M. A., STAMBAUGH R., FLICKINGER G., MASTROIANNI L. JR, 1970. Uterine and oviduct fluid patterns in the rabbit before and after ovulation. *Fertil. Steril.*, **21**, 860-865.
- WHITE I. G., WALLACE J. C., 1961. Breakdown of seminal glyceryl-phosphorylcholine by secretions of the female reproductive tract. *Nature*, **189**, 843.
- WOKRESENSKY M. A., 1891. Experimentale Untersuchung über die Pyo-und Hydrosalpinxbildung bei den Tieren. *Zentralbl. Gynäk.*, **15**, 849.