



Ovarian gonadotropin receptors changes during the annual reproductive-cycle in the common trout (salmo-trutta)

Bernard Breton, Elisabeth Sambroni

► To cite this version:

Bernard Breton, Elisabeth Sambroni. Ovarian gonadotropin receptors changes during the annual reproductive-cycle in the common trout (salmo-trutta). *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 1989, 308, pp.495-500. hal-02728203

HAL Id: hal-02728203

<https://hal.inrae.fr/hal-02728203>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Évolution du nombre des récepteurs gonadotropes ovariens au cours du cycle reproducteur annuel chez la truite fario *Salmo trutta* L.

Bernard BRETON et Élisabeth SAMBRONI

Résumé — L'évolution de la liaison spécifique de la GtH maturante de saumon à des fractions membranaires d'ovaire de truite fario (*Salmo trutta*) a été suivie au cours du cycle annuel. Le nombre de sites récepteurs par milligramme de protéines membranaires augmente significativement en avril-mai passant de $1,12$ à $2,18 \cdot 10^{-11}$ Moles. mg^{-1} à l'époque de l'initiation de la synthèse et de l'incorporation de vitellogénine. Il reste constant et plus faible pendant la vitellogenèse pour être multiplié par environ 10 chez les animaux ovulés ($8,80 \cdot 10^{-11}$ Moles. mg^{-1}). Durant la période périovulatoire le coefficient d'affinité (kd) est également multiplié par 2.

Ovarian gonadotropin receptors changes during the annual reproductive cycle in the common trout (*Salmo trutta*)

Abstract — The specific binding of the maturing salmon GtH to ovarian membrane fractions from the common trout (*Salmo trutta*) has been followed over the annual reproductive cycle. The number of receptors sites per milligramme of membrane proteins significantly increased in April-May during the initiation of the synthesis and the incorporation of the vitellogenin, increasing from 1.12 to 2.18×10^{-11} Moles. mg^{-1} . It remained stable and lower during the vitellogenesis and was about 10 times greater at the time of ovulation reaching 8.8×10^{-11} Moles. mg^{-1} in ovulated females. During the periovulatory period the affinity coefficient (kd) equally increased being multiplied by 2.

Abridged English Version — In female salmonids it is generally admitted that the maturing gonadotropin (GtH) is involved in the regulation of some of the steps in gametogenesis [1], in which it directs the ovarian steroidogenesis pathways ([2], [3], [4]). As in other vertebrates, the first step of its action is to bind to ovarian receptors as has been demonstrated in the common trout (*Salmo trutta*) [5] and the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ([6]-[7]). The important modifications of the ovarian sensitivity to GtH action throughout the annual reproductive cycle could be linked to a variation in the number of ovarian receptors and characteristics such as their affinity. In this study we have followed the GtH receptors at different phases of female gametogenesis in the common trout, including stages which were thought to be insensitive to GtH action (previtellogenesis and endogenous vitellogenesis).

10 females were sacrificed each month and their ovaries plunged into liquid nitrogen immediately after decapitation. The membrane fractions were prepared according to the method already described [5]. After thawing of the ovaries in a mineral medium adjusted to the pH and osmotic pressure of the trout blood sera, the vitellus was discarded by crushing and several washings. The follicular envelopes were then crushed in a tris HCl 0.01 M CaCl_2 10 mM Saccharose 0.15 M buffer and filtered through a nylon cloth (150 mesh). The resulting filtrate was submitted to three successive centrifugations at 1,000, 20,000 and 110,000 g. All the studies were done on the 110,000 g pellets. The specific binding of iodinated GtH to these pellets was determined for each animal after determination of their protein contents according to the Lowry method [10]. The pellets corresponding to the different stages of the gametogenesis were pooled in order to study the receptor characteristics [number and affinity coefficient (kd)] after a Scatchard transformation.

Note présentée par Maurice FONTAINE.

As shown on the Figure, the specific binding of the iodinated GtH to the 110,000 g pellets first increased in April and May as compared to January (1,351 Cpm per milligramme of membrane protein against 759). This corresponds to the time of exogenous vitellogenesis induction. Then, it decreased, returning to the values found in January and remained at this level during the period of exogenous vitellogenesis, *i.e.* up to November. It was only in maturing and ovulating females that there was a drastic increase of the binding, which reached its maximum value (2,122 Cpm per milligramme of membrane protein) in ovulated females. When referred to the total amount of membrane protein in the ovaries this increase was more significant, $p \leq 0.005$ (Fig.). This was confirmed by the determination of the number of GtH receptors (Table). There were two periods during which the number of gonadotropin receptors increased: first between February and May, when it was doubled from 1.12 to $2.18 \text{ moles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-11}$, but the most important variations were measured during the periovulatory period. Their number was multiplied by 6 at the time of oocyte maturation, and they continued to increase during ovulation (reaching $8.8 \text{ moles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-11}$, a value twelve times higher than at the end of the vitellogenesis). They returned to low values ($1.12 \text{ mole} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-11}$) one month later. It was also during the same period that the receptor affinity presented a marked variation. The k_d was less than 10^9 Moles^{-1} through the period of gametogenesis from February to November (Table) and increased to 1.26 during oocyte maturation.

These results show that gonadotropin receptors exist before the induction of the exogenous vitellogenesis, and during all stages of the gametogenesis, which would all be under the influence of the maturing GtH. This does not mean, that this hormone is the only one implicated in the regulation of the female gametogenesis, nor that it plays the main role in the regulation of each phase. Indeed, it had been suggested that the total complexation of the vitellogenesis would necessitate the action of another GtH [12]. A second gonadotropin which may be preferentially secreted during the early phases of the gametogenesis, has recently been isolated from salmon pituitary glands [13], but up to now it has not been clearly differentiated from the maturing GtH on the basis of their biological activities [14]. During the induction of the exogenous vitellogenesis and of the final steps of maturation there is a simultaneous increase in blood sera GtH levels [1] and the number of GtH receptors, which reinforces the hypothesis that the maturing GtH could play a major role in the control of these two phases and suggests that it could be involved in the regulation of its own receptors. The increase of the k_d , altogether with the number of GtH receptors could modify ovarian sensitivity to GtH action during maturation. Does the increase in GtH receptors correspond to a neosynthesis or rather the unmasking of preexisting receptors? Up to now there is no data to answer this question.

Chez les salmonidés, il est admis que la gonadotropine maturante (GtH) est impliquée dans la régulation de certaines des étapes de la gamétogenèse femelle. Par exemple, il existe des modifications marquées des niveaux plasmatiques de cette hormone chez la truite fario (*Salmo trutta*) au moment de l'initiation de la synthèse et de l'incorporation de vitellogénine et durant les phases finales de maturation ovocytaire [1]. Le rôle de cette hormone est de stimuler et orienter la stéroïdogénèse ovarienne ([2], [3], [4]) pour la production d'estradiol 17β au cours de la vitellogénèse, ou de 17α hydroxy 20β dihydroprogesterone pour l'induction de la maturation ovocytaire. Comme chez les autres vertébrés l'action primaire de cette hormone passe par sa liaison à des récepteurs ovariens

qui ont été mis en évidence chez la truite commune (*Salmo gairdneri*) [5] et le saumon amago (*Oncorhynchus rhodurus*) ([6]-[7]). La modification importante de la sensibilité ovarienne à l'action gonadotrope au cours du cycle [8] pourrait sans doute impliquer des variations du nombre et des caractéristiques des récepteurs gonadotropes ovariens en fonction des étapes de la gamétogenèse. C'est ce que nous avons cherché à préciser dans ce travail, en même temps que nous avons recherché la présence de ces récepteurs à des stades supposés non sensibles à l'action de la GtH : prévitellogenèse, vitellogenèse endogène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les truites proviennent de la salmoniculture expérimentale de Gournay/Aronde. Ce sont des animaux en deuxième reproduction d'un poids moyen, de 1,5 kg, se reproduisant naturellement en novembre-décembre. Les caractéristiques des variations endocriniennes de cette souche au cours du cycle ont fait l'objet d'une étude préalable [1].

Elles ont été sacrifiées individuellement à raison de 10 animaux par sacrifice. Les ovaires sont plongés dans l'azote liquide aussitôt après décapitation. Les fractions membranaires ont été préparées séparément pour chaque animal selon la méthode précédemment décrite [5]. En résumé, après décongélation des ovaires dans un milieu minéral ajusté au pH et à la pression osmotique du plasma sanguin de la truite, le vitellus est éliminé par écrasement et lavages abondants dans ce milieu. Les enveloppes folliculaires sont alors broyées dans un tampon tris HCl 0,01 M — CaCl₂ 10 mM saccharose 0,15 M à l'aide d'un homogénéiseur polytron (10 s) et filtrées sur toile de nylon (150 µm). Le filtrat est soumis à trois centrifugations successives à 1 000, 20 000 et 110 000 g. Tout le travail suivant a été réalisé sur le culot 110 000 g. Toutes ces opérations sont effectuées en présence d'inhibiteur de trypsine de fève de soja (0,5 mg/ml) et paraamino benzamidine (10 mM).

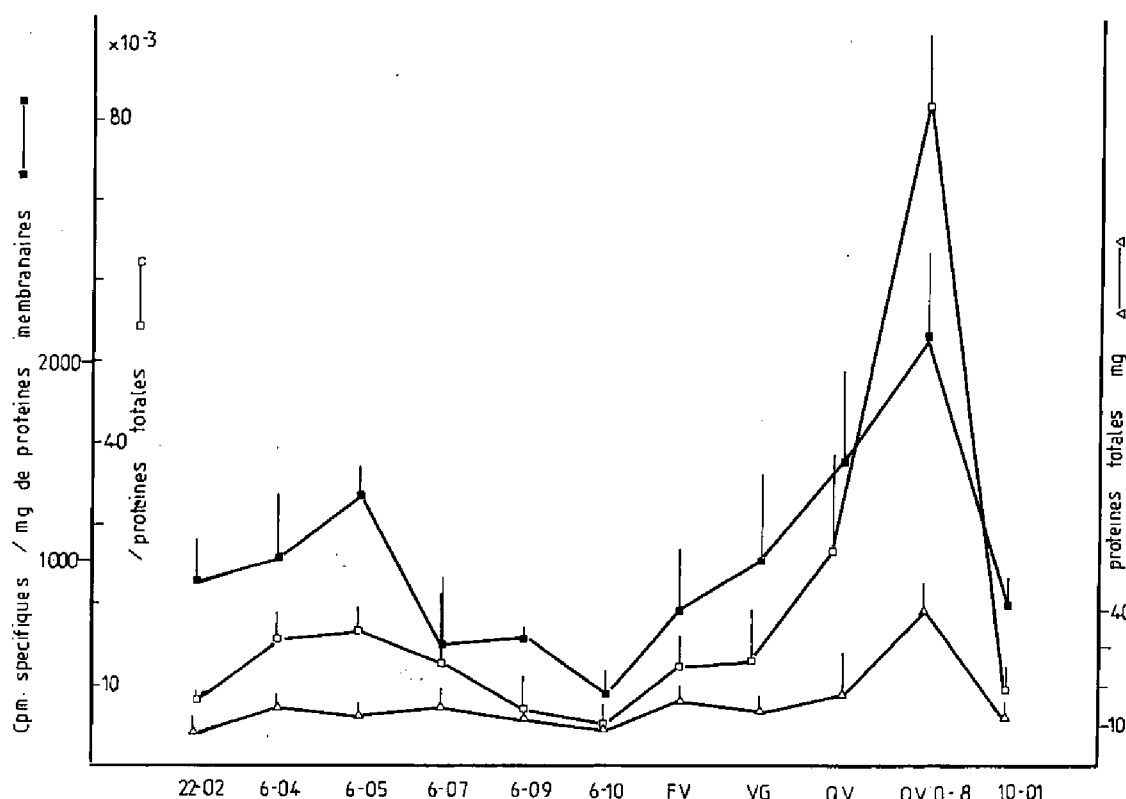
La GtH est marquée à l'iode 125 par la lactoperoxydase, de façon à ce que son activité spécifique n'excède pas 40 µCi/µg, calculée après détermination du rendement d'iodation.

La liaison spécifique par milligramme de protéines membranaires exprimée en Cpm, en présence de 20 000 Cpm d'hormone iodée, a été déterminée pour les ovaires de chaque animal. La liaison aspécifique est mesurée après addition de 1 µg de GtH froide. Les membranes correspondant à des stades bien individualisés (fin de vitellogenèse-ovocytes présentant une vésicule germinale périphérique — animaux maturants-animaux ovulés depuis moins de 7 jours) ou à des dates de prélèvement sont alors réunies pour la détermination des caractéristiques des récepteurs (nombre-constante d'affinité) par une étude en saturation et transformation de Scatchard [9]. Tout le travail a été fait en utilisant des triplicats.

La détermination des contenus protéiques des membranes est réalisée selon la méthode de Lowry [10].

La comparaison des liaisons spécifiques par milligramme de protéines membranaires ou par paires d'ovaires a été faite à l'aide du test de Student. La comparaison des kd (pentes des droites obtenues après transformation de Scatchard) a été faite par analyse de covariance.

RÉSULTATS. — La quantité de GtH spécifiquement liée augmente significativement ($p \leq 0,01$) entre le mois de janvier et les mois d'avril et mai (fig.). Elle passe de 759 à 1 351 Cpm par milligramme de protéines membranaires. Elle reste au même niveau en mai; puis elle diminue et reste faible, autour des mêmes valeurs, pendant toute la durée de la vitellogenèse exogène pour augmenter à nouveau pendant la maturation ovocytaire



Évolution de la liaison de la GtH maturante iodée à des fractions membranaires (110 000 g) d'ovaires de truite fario (*Salmo trutta* L.). 22.02 : jour et mois de l'année ($n=10$); FV : fin de vitellogenèse ($n=6$); VG : vésicule germinale périphérique ($n=5$); OV : maturants ou en cours d'ovulation ($n=11$); OV 0-8 : animaux sacrifiés entre 0 et 8 jours après l'ovulation ($n=7$). Les liaisons sont exprimées en : ■ — — ■ Liaison spécifique rapportée au milligramme de protéines membranaires Cpm/mg. □ — — □ Liaison spécifique rapportée aux protéines membranaires ovariennes totales. △ — — △ Évolution de la quantité totale de membranes 110 000 g en milligramme en fonction du stade de la gamétogenèse ou de la date de prélèvement (mg/paire d'ovaires).

Evolution of the iodinated maturing GtH binding to 110,000 g ovarian membranes from the common trout (*Salmo trutta* L.). 22.02; day and month of the year ($n=10$); FV: end of vitellogenesis ($n=6$); VG: germinal vesicle at the periphery of the oocyte ($n=5$); OV: maturing and ovulating females ($n=11$); OV 0-8: animals taken between 0 and 8 days after ovulation ($n=7$). Binding are expressed in: ■ — — ■ Cpm specifically bound per milligramme of membrane proteins ($\bar{X} \pm SD$). □ — — □ Cpm specifically bound to the total 110,000 g ovarian membrane proteins. △ — — △ Evolution in milligramme of the total 110,000 g ovarian membrane proteins in relation with the date of sampling or of the stage of the gametogenesis.

et l'ovulation. Elle est maximale dans le tissu ovarien des animaux ovulés sacrifiés entre 0 et 8 jours après l'ovulation (2 122 Cpm par milligramme de protéines membranaires).

Les quantités totales de protéines membranaires 110 000 g restent relativement stables pendant tout le cycle, à l'exception des animaux ovulés chez lesquels elles augmentent significativement ($p \leq 0,005$) (fig.). Ceci se traduit par une augmentation encore plus significative du nombre total de Cpm liés par paire d'ovaires durant cette période (82 473 Cpm, $p \leq 0,001$). L'augmentation d'avril demeure significative ($p \leq 0,05$) : 8 049 Cpm en février — 15 791 Cpm en avril — 16 621 Cpm en mai.

Le calcul du nombre de récepteurs par milligramme de protéines membranaires confirme ce résultat (tableau). Ce nombre double entre la fin février et le mois d'avril et est multiplié par environ 6 entre la fin de la vitellogenèse et la maturation. Il augmente

TABLEAU

Variation du nombre de récepteurs ovariens à la GtH maturante et de leur constante d'affinité en fonction de la date de prélèvement ou du stade de la gamétogenèse. Les valeurs sont données en $\text{Mole} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines membranaires 110 000 g. Les résultats ont été obtenus après une étude en saturation et transformation de Scatchard.

Variations of the number of maturing GtH ovarian receptors and the their affinity constants (kd) with the date of sampling or the stage of the gametogenesis. Values are given per milligramme of 110,000 g membranes proteins. Results are issued from a saturation study transformed by Scatchard plot.

Date ou stade	10,01	22,02	6,04	6,05	6,07	FV	Maturation	Animaux ovulés
Nombre de récepteurs en								
$\text{Moles} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 10^{-11}$	1,56	1,12	1,70	2,18	0,61	0,71	4,15	8,80
$\text{kd} \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	1,04	0,68	0,69	0,95	0,75	0,51	1,26	1,23

encore après ovulation, puisque c'est dans le tissu ovarien prélevé entre 0 et 8 jours postovulation que l'on retrouve les valeurs les plus élevées (facteur multiplicatif ≈ 12).

Durant la gamétogenèse les constantes d'affinité (kd) restent relativement stables. Ils augmentent entre la fin de la vitellogenèse et la maturation, période durant laquelle ils sont pratiquement doublés ($p \leq 0,01$).

DISCUSSION. — Ce travail montre que comme chez le saumon amago (*Oncorhynchus rhodurus*) [11], les récepteurs gonadotropes à la GtH maturante existent durant tout le cycle sexuel et que durant la gamétogenèse les constantes d'affinité (kd) que nous avons mesurées sont comparables à celles trouvées dans cette espèce. Ces résultats laissent supposer que toutes les phases de ce cycle sont dépendantes, à un degré plus ou moins important, de l'action de cette hormone, et en particulier les phases les plus précoces, antérieures à l'initiation de la synthèse et de l'incorporation de la vitellogénine. Ceci ne signifie pas que cette hormone soit la seule impliquée dans la régulation de ces phénomènes. Il avait en particulier, été suggéré que le contrôle de la vitellogenèse nécessiterait l'action d'une deuxième gonadotropine [12]. Une deuxième GtH a été récemment isolée à partir d'hypophyses de saumon [13] qui serait préférentiellement sécrétée durant les phases précoces de la vitellogenèse. Jusqu'à présent ses activités biologiques ne la différencient pas de la GtH maturante [14]. Une étude de la compétition de cette hormone vis-à-vis de la liaison de la GtH maturante à ses récepteurs, permettrait sans doute une meilleure différenciation biologique de ces deux hormones. Durant l'initiation de la vitellogenèse exogène (avril-mai) et pendant les phases de maturation finale, il y a élévation simultanée du nombre de récepteurs ovariens et des niveaux gonadotropes plasmatiques comme nous l'avons montré précédemment [1]. La simultanéité des deux phénomènes paraît renforcer l'hypothèse d'un rôle déterminant de la GtH maturante dans le contrôle de l'initiation de la vitellogenèse exogène et suggère que la GtH maturante pourrait être impliquée dans l'induction de ses propres récepteurs. Au cours de la maturation l'augmentation du kd en même temps que celle du nombre de récepteurs ovariens pourrait également contribuer à une modification de la sensibilité ovarienne à l'action de l'hormone.

La multiplication par un facteur d'environ 10 du nombre des récepteurs à la GtH maturante pose le problème de leur régulation qui pourrait correspondre à une néosynthèse ou à un démasquage de sites préexistants. Le schéma mammalien de régulation des récepteurs à LH nécessitant entre autres l'action de la FSH en présence d'estradiol, n'apparaît sans doute pas le plus plausible chez le poisson, chez lequel les niveaux

d'estradiol plasmatique sont au contraire très bas au moment de l'ovulation, et les caractéristiques d'action biologique de la deuxième GtH ne la différenciant pas pour le moment de la GtH maturante.

Ce travail a reçu le soutien de l'accord Cadre INFRA-IFREMER. Convention 87/P210628 Y.

Note remise le 9 janvier 1989, acceptée après révision le 28 mars 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] B. BRETON, A. FOSTIER, Y. ZOHAR P. Y. LE BAIL et R. BILLARD, *Gen. Comp. Endocr.*, 49, 1983, p. 220-231.
- [2] A. FOSTIER, B. JALABERT, R. BILLARD B. BRETON et Y. ZOHAR, In *Fish Physiology*, W. S. HOAR, D. J. RANDALL et E. M. DONALDSON éd., IXA, p. 277-372. Academic Press, New York.
- [3] A. FOSTIER et B. JALABERT, *Fish Physiol. Biochem.*, 2, 1986, p. 87-99.
- [4] Y. NAGAHAMA, *Zool. Sci.*, 4, 1987, p. 209-222.
- [5] B. BRETON, F. LE GAC et E. SAMBRONI, *Gen. Comp. Endocr.*, 64, 1985, p. 163-171.
- [6] C. SALMON, H. KAGAWA, S. ADACHI et Y. NAGAHAMA, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 298, série III, 1984, p. 337-340.
- [7] A. KANAMORI, H. KAGAWA et Y. NAGAHAMA, *Gen. Comp. Endocr.*, 66, 1987, p. 210-217.
- [8] B. JALABERT et A. FOSTIER, *Aquaculture*, 43, 1984, p. 1-11.
- [9] ROTHBARD, *Mathematics of hormone receptor interaction*, I, 1983, p. 289-327, B. W. O'MALLEY et A. R. MEANS éd., Plenum New York.
- [10] O. H. LOWRY, *J. Biol. Chem.*, 195, 1951, p. 265-275.
- [11] A. KANAMORI et Y. NAGAHAMA, *Gen. Comp. Endocr.*, 72, 1988, p. 25-38.
- [12] D. R. IDLER, In *Reproductive Physiology of Fish*, 1982, p. 4-13. Proceedings of the International Symposium on reproductive physiology of fish, C. J. J. RICHTER et H. J. Th. GOOS éd., PUDDOC, Press Wageningen The Netherlands.
- [13] K. SUZUKI, H. KAWAUCHI et Y. NAGAHAMA, *Gen. Comp. Endocr.*, 71, 1988, p. 292-301.
- [14] P. SWANSON, M. BERNARD, M. NOZAKI, K. SUZUKI, H. KAWAUCHI et W. W. DICKHOFF, Proceeding of the first International Symposium on Fish Endocrinology, *J. Fish Physiol.*, 1989 (in Press).

Laboratoire de Physiologie des Poissons,
I.N.R.A., campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex.