HAL
open science

# Actions de stimulations gonadotropes pulsatiles sur l'incorporation de vitellogénine in vitro par des follicules de truites incubés dans un système de perifusion ouvert

Bernard Breton, M.C. Derrien-Guimard

▶ **To cite this version:**

Bernard Breton, M.C. Derrien-Guimard. Actions de stimulations gonadotropes pulsatiles sur l'incorporation de vitellogénine in vitro par des follicules de truites incubés dans un système de perifusion ouvert. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1983, 296, pp.857-860. hal-02728479

**HAL Id: hal-02728479**

**https://hal.inrae.fr/hal-02728479v1**

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

ENDOCRINOLOGIE. — *Actions de stimulations gonadotropes pulsatiles sur l'incorporation de vitellogénine* in vitro *par des follicules de Truites incubés dans un système de perifusion ouvert.* Note (*) de **Bernard Breton** et **Marie-Claire Derrien-Guimard,** présentée par Maurice Fontaine.

Des follicules de Truite arc-en-ciel maintenus *in vitro* dans un système de périfusion ouvert incorporent significativement plus de vitellogénine lorsqu'ils sont soumis à une stimulation gonadotrope pulsatile que lorsque le milieu est anhormonal. La majeure partie de la vitellogénine néo-incorporée se retrouve dans le cytosol ovocytaire. Ces résultats démontrent l'effet stimulant intrinsèque de la GtH « maturante » sur l'incorporation de la vitellogénine.

*ENDOCRINOLOGY.* — Action of Pulsatile Gonadotropic Stimulation on the *in vitro* Incorporation of Vitellogenin by Trout Follicles Incubated in an Open Perifusion System.

*Rainbow Trout follicles incubated* in vitro *in an open perifusion system, incorporated statistically more vitellogenin after a pulsatile gonadotropic stimulation than after a perifusion without GtH. Most of the newly incorporated vitellogenin is found within the oocyte cytosol. These results demonstrate the intrinsic stimulatory effect of the "maturing" GtH on the vitellogenin incorporation.*

Le nombre et la nature des hormones intervenant dans la régulation des mécanismes d'incorporation du vitellus sont toujours controversés chez les Poissons téléostéens ([1], [2]). Deux hypothèses sont en présence. L'action d'une seule gonadotropine (GtH), isolée à partir de ses propriétés maturantes, est suffisante pour induire une vitellogenèse totale, mécanisme démontré chez le Poisson rouge [3], l'Anguille [2] et le Poisson chat indien [4] mais dans le contrôle duquel l'intervention d'autres hormones hypophysaires n'est pas rejetée. Cette GtH stimule la plupart des activités stéroïdogènes dans ces espèces [5] mais aussi chez les Salmonidés, chez lesquels par contre elle n'a jamais induit de vitellogenèse totale aussi bien chez l'adulte que l'immature intact ou hypophysectomisé ([1], [6]). Cette constatation a conduit à une seconde hypothèse selon laquelle une seconde gonadotropine, dite vitellogénique, serait nécessaire pour stimuler l'incorporation de vitellogénine ([7], [8]). Une hormone active sur ce phénomène a été partiellement purifiée [7]. L'action vitellogénique de la gonadotropine maturante, un moment suspectée, a été par la suite attribuée à sa contamination par de l'hormone vitellogénique. Tous ces travaux résultent d'études faites *in vivo* dans lesquelles les effets des hormones étaient étudiés le plus souvent après des injections répétées. Ils font abstraction des particularités d'action que pourrait imposer le mode de sécrétion pulsatile de la GtH maturante au cours de la vitellogenèse [9]. Pour cette raison, dans ce travail nous avons étudié les effets de la stimulation ovarienne par des pulses de GtH maturante sur l'incorporation *in vitro* de vitellogénine par des follicules de Truite arc-en-ciel (*Salmo Gairdneri*).

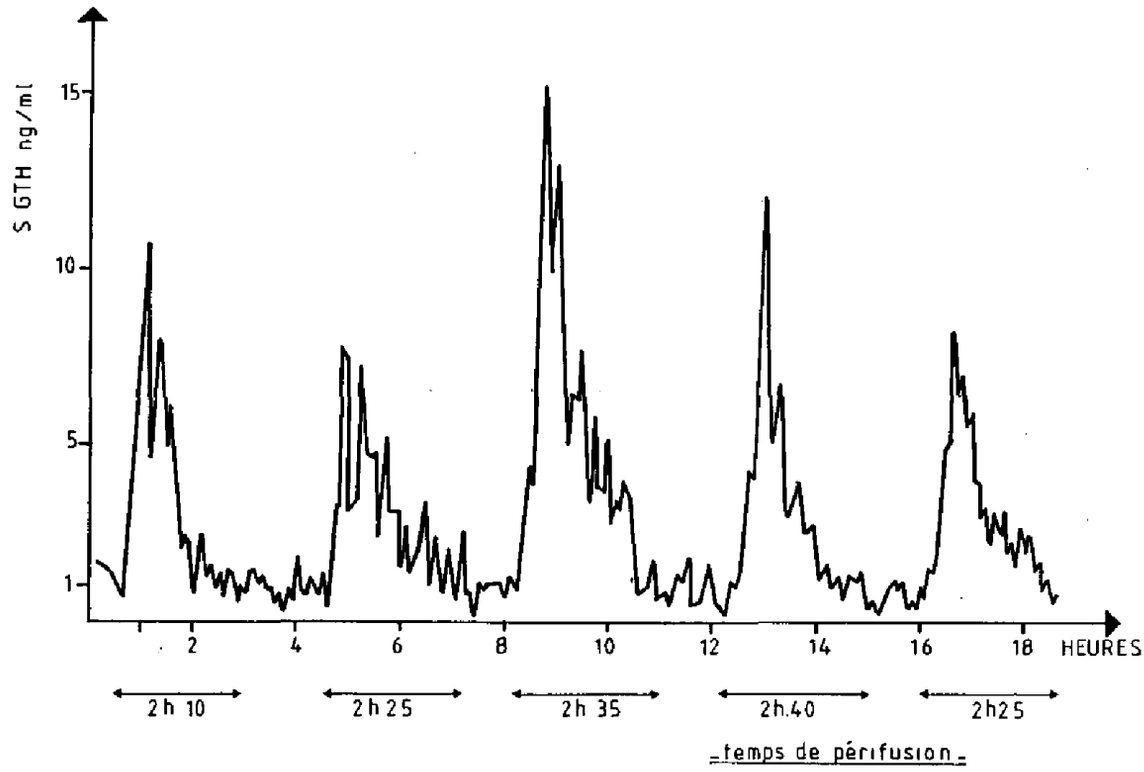
MATÉRIELS ET MÉTHODE. — 1. *Périfusion ovarienne.* — Elle est réalisée selon Zohar [9]. Les lamelles ovigères sont placées dans une cellule de verre alimentée par un milieu minéral de base [10] à pH 8.0, ajusté à la P.O. de 300 m osM, contenant 1 mg/ml de sérum albumine bovine et 800 cpm de vitellogénine tritiée (17 μg/ml). Le débit horaire est de 15 ml/h. Le milieu est enrichi en gaz ($N_2-O_2$ 50/50) par échange à contre courant, les fragments ovariens sont fixés au sommet de la cellule, dont le contenu est maintenu sous agitation constante par un microagitateur magnétique. Le périfusat peut être soit éliminé, soit collecté à l'aide d'un collecteur de fraction. Deux cellules (1 référence, 1 expérimentale) alimentées par le même milieu de base sont utilisées en parallèle, l'une servira de témoin, l'autre recevra une stimulation gonadotrope.

2. *Préparation de la vitellogénine marquée.* — L'utilisation d'un anticorps spécifique anti-vitellogénine de Truite arc-en-ciel [11] a permis de suivre la dynamique d'incorporation de Leucine $H^3$ dans la vitellogénine de Truite arc-en-ciel canulée et estrogénisée et de définir les conditions de traitement optimales pour l'obtention d'une activité spécifique élevée de la vitellogénine marquée *in vivo*. Les conditions suivantes ont été retenues. Une femelle en vitellogenèse active (∅ des follicules supérieur à 3 mm) d'un poids de 1,65 kg a reçu quatre injections

successives d'estradiol, 17 β (0,5 mg/kg). En même temps que la dernière injection d'estradiol, l'animal a reçu par voie intrapéritonéale, 1 mCi d'un mélange d'acides aminés tritiés (TRK 440, Amersham). L'animal est sacrifié 30 h après et son sang prélevé sur héparine dans un vaisseau caudal. La vitellogénine est purifiée à partir du plasma par la méthode déjà décrite [11]. Le produit final obtenu possède une activité spécifique de 46.62 µCi/µg soit 27.97 Ci/Mole, sur la base d'un poids moléculaire d'environ 600000.

3. *Introduction des pulses dans la cellule expérimentale.* — Dans la technique originale [9] l'introduction de la GtH dans le système se faisait à l'aide d'un robinet trois voies. Une automatisation du système permettant des périfusions prolongées avec introduction de pulses à un moment donné, d'amplitudes et durées fixées au préalable, a été réalisée en utilisant un préparateur de gradient « LKB 11300 Ultrograd » reproduisant la programmation imposée par un diagramme pré-découpé. La mesure du coefficient de dilution de la cellule pour un débit donné permet d'obtenir une amplitude (ng/ml) donnée en fixant la concentration de la solution mère de GtH à introduire dans le système. Dans notre expérience l'amplitude théorique des pulses de GtH a été fixée à 10 ng/ml à partir d'un niveau de base de 1 ng/ml. Leur fréquence est de un toutes les 4 h. Le profil pratique obtenu a été tracé après dosage radio-immunologique de l'hormone dans les effluents collectés en sortie de cellule.

4. *Mesure de l'incorporation de vitellogénine.* — Les follicules utilisés proviennent d'une femelle en vitellogenèse exogène (∅ 3.3 mm). Chaque cellule contient 200 follicules. A la fin de la périfusion, les follicules sont lavés trois fois par du milieu froid sans vitellogénine après avoir été individualisés des lamelles ovigères et groupés par cinq. Ils sont alors soit dissous dans 525 µl de Soluène S. 350 par chauffage à 50°C pendant 1 h; après solubilisation, ils sont comptés dans 2 ml de xylène; soit broyés dans 1 ml de milieu dans un homogénéiseur verre-téflon; le broyat est centrifugé 20 mn à 4200 r.p.m., les surnageants sont comptés après addition de 15 ml de « Lumagel » tandis que les culots de centrifugation représentant les fragments des enveloppes folliculaires sont lavés, dissous dans le Soluène S. 350 et comptés.




Représentation de la concentration réelle en GtH, des effluents de la cellule de périfusion ovarienne.

*Graph of real concentration of GtH of effluents of the ovarian perifusion cell.*

RÉSULTATS. — La figure montre le profil de la concentration en gonadotropine circulant dans la cellule sur une durée de 18 h. L'amplitude moyenne des pulses de GtH a été de 10,82 ± 3,04 ng/ml. Pour chaque séquence l'augmentation de la concentration en GtH est très rapide mais le retour au niveau de base de 1 µg/ml est plus lent, entre 2 h 10 et 2 h 40 après le début de la stimulation. Un niveau gonadotrope supérieur à 5 ng/ml est maintenu pendant environ 1 h après le début de l'introduction des pulses.

Le tableau résume les valeurs d'incorporation de vitellogénine marquée. Il existe une différence hautement significative ($p<0.05$, test de Student) entre la quantité totale de radioactivité liée aux follicules recevant la GtH et celle liée aux follicules soumis à un milieu anhormonal. Après broyage, il n'existe pas de différence significative entre les quantités de vitellogénine liée aux enveloppes folliculaires quel que soit le traitement auquel elles ont été soumises, et la radioactivité qui y est liée est faible. Elle se retrouve majoritairement dans les surnageants correspondant aux cytosols ovocytaires qui contiennent une quantité de vitellogénine marquée significativement plus élevée après stimulation gonadotrope pulsatile des follicules. Dans nos conditions expérimentales (concentration de vitellogénine 17 µg/ml, débit 15 ml/h) 442 µg de protéine ont été fixés en 24 h par les 200 follicules de la cellule recevant les pulses de GtH dont 330 µg se retrouvent dans le cytosol, correspondant respectivement à 7,2 et 5,39 % de la quantité totale de vitellogénine ayant traversé la cellule pendant cette période.

Dans la cellule ne recevant pas de gonadotropine, ces valeurs sont plus faibles et respectivement de 3.07 et 1.79 % correspondant à 188 et 109 µg de vitellogénine.

TABLEAU

Valeurs moyennes de cinq répétitions ± écart-type

*Average values of five repeats ± typical gap*

| c.p.m./5 follicules/24 h | | Vitellogénine/mm²/24 h (ng) | | Vitellogénine incorporée/ 200 follicules/24 h (µg) | | Vitellogénine ayant traversé la cellule (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pulse | Témoin | Pulse | Témoin | Pulse | Témoin | Pulse | Témoin |
| Follicules entiers | | | | | | | |
| 521 ± 24 | 223 ± 15 | 16,28 ± 0,73 | 6,94 ± 0,54 | 442,8 ± 19,8 | 188,7 ± 14,8 | 7,2 | 3,07 |
| Enveloppes folliculaires | | | | | | | |
| 37 ± 7 | 23 ± 7 | 0,72 ± 0,21 | 0,58 ± 0,20 | 19,51 ± 5,7 | 15,7 ± 5,4 | 0,31 | 2,56 |
| Cytosol ovocytaire | | | | | | | |
| 389 ± 103 | 132 ± 34 | 12,14 ± 4,5 | 4,02 ± 1,07 | 330,2 ± 122 | 109,3 ± 29,1 | 5,39 | 1,78 |

DISCUSSION. — Les techniques de marquage *in vitro* des protéines font appel pour la plupart à des procédés d'oxydation plus ou moins dénaturants surtout pour une molécule telle que la vitellogénine, dont on peut penser que l'oxydation puisse altérer certaines de ses chaînes lipidiques et son affinité pour d'éventuels récepteurs folliculaires. Le marquage *in vivo* évite cet écueil, la vitellogénine additionnée dans le milieu doit posséder des caractéristiques proches de la protéine plasmatique dont les concentrations dans le plasma sont cependant beaucoup plus élevées que celle que nous avons utilisée [13], alors que les concentrations en GtH du milieu reproduisent au contraire les niveaux naturels de GtH plasmatique en cours de vitellogenèse ([9], [12]). Malgré cette restriction notre expérience montre que la GtH stimule la radioactivité totale liée aux follicules, la majeure partie étant incorporée dans les cytosols ovocytaires. Au contraire il n'existe pas de différence significative entre les c.p.m. liés aux enveloppes folliculaires des follicules non soumis à la gonadotropine et ceux soumis à une stimulation gonadotrope pulsatile. Ceci pourrait être dû à un transfert très rapide de la vitellogénine vers l'ovocyte, le temps de transfert étant inférieur à 20 mn chez *Fundulus heteroclitus* et *Cyprinodon variegatus* [14]. Ces résultats

confirment l'existence d'un contrôle hypophysaire de l'incorporation de la vitellogénine chez la Truite arc-en-ciel. Sans rejeter la participation éventuelle d'autres hormones hypophysaires dans le contrôle de ce phénomène, ils montrent que le GtH « maturante » pourrait jouer un rôle important à condition qu'elle soit appliquée selon un mode reproduisant les variations de sa sécrétion naturelle. Dans notre expérience, les deux cellules n'ont pas reçu les mêmes quantités totales de GtH. La comparaison de deux modes de stimulation pulsatile et constant, utilisant des quantités équivalentes de GtH reste à faire pour conclure sur le rôle favorisant des pulsations de GtH sur l'incorporation de vitellogénine. Il faut cependant remarquer que, jusqu'à présent, dans tous les travaux réalisés chez les Salmonidés, la GtH a été utilisée à forte dose en injections répétées qui maintiennent en permanence des niveaux élevés de GtH plasmatiques qui pourraient conduire à des phénomènes de « down régulation » et à la non-incorporation de la vitellogénine.

(*) Remise le 2 mai 1983.

[1] D. R. IDLER, *Proceed. Int. Symp. Reprod. Physiol. of Fish*, Wageningen, The Netherlands, C. J. J. RICHTER et H. J. Th. GOOS, éd., Pudoc Wageningen, 1982, p. 4.

[2] E. BURZAWA-GERARD, *Proceed. Int. Symp. Reprod. Physiol. of Fish*, Wageningen, The Netherlands, C. J. J. RICHTER et H. J. Th. GOOS, éd., Pudoc Wageningen, 1982, p. 19.

[3] E. BURZAWA-GERARD, *Mémoires du Muséum*, série A, 86, 1974, p. 1.

[4] B. I. SUNDARARAJ, P. NATH et E. BURZAWA-GERARD, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 46, 1982, p. 93.

[5] A. FOSTIER, B. JALABERT, R. BILLARD, B. BRETON et Y. ZOHAR, In *Fish Physiology*, IX, Reproduction, W. S. HOAR, D. J. RANDALL et E. M. DONALDSON, éd., Academic Press, N.Y., 1983 (sous presse).

[6] S. N. UPADHAYAY, B. BRETON et R. BILLARD, *Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys.*, 18, 1978, p. 1019.

[7] D. R. IDLER et T. B. NG, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 38, 1979, p. 421.

[8] T. B. NG et D. R. IDLER, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 35, 1978, p. 189.

[9] Y. ZOHAR, *Thèse Doctorat d'État*, Paris-VI, 1982, 273 p.

[10] B. JALABERT, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 33, 1976, p. 974.

[11] P. Y. LE BAIL et B. BRETON, *Aquaculture*, 22, 1981, p. 367.

[12] B. BRETON, A. FOSTIER, Y. ZOHAR, P. Y. LE BAIL et R. BILLARD, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 49, 1983, p. 220.

[13] L. W. CRIM et D. R. IDLER, *Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys.*, 18, 1978, p. 1001.

[14] K. SELMAN et R. A. WALLACE, *Proceed. Int. Symp. Reprod. Physiol. of Fish*, Wageningen, The Netherlands, C. J. J. RECHTER et H. J. Th. GOOS, éd., Pudoc Wageningen.

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