

LIAISON DE L'OESTRADIOL-17 $\beta$  DANS LES HEPATOCYTES DE TRUITE ARC-EN-CIEL  
ET INDUCTION DE LA VITELLOGENINE ET DE SON ARNm SPECIFIQUE.

J.L. MAITRE, L. MERCIER, L. DOLO et Y. VALOTAIRE

Laboratoire de Biochimie Générale, Campus de Beaulieu, UER SVE,  
Université de RENNES I, 35042 Rennes Cedex.  
ERA C.N.R.S. n° 567.

R E S U M E.

Chez toutes les espèces ovipares étudiées à ce jour, la synthèse et l'utilisation de la vitellogénine (Vg) est un phénomène intimement lié à la reproduction. La synthèse de la Vg dans le foie de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*) est sous la dépendance de l'oestradiol ( $E_2$ ) qui agit vraisemblablement selon le schéma classique du mécanisme d'action des hormones stéroïdes. Après liaison de l'hormone à un récepteur spécifique, le complexe oestradiol-récepteur migre dans le noyau où il interagit avec l'ADN et module l'expression du gène de la Vg, ce qui se traduit par une augmentation de la synthèse de ARNm Vg et de Vg. Nous montrons ici : (1) la présence de récepteurs spécifiques des oestrogènes (constante de dissociation  $K_D = 1,5 \times 10^{-9}M$  pour  $E_2$ ) dans le cytosol du foie de truite mâle. (2) Le foie du mâle constitue un contrôle expérimental idéal au niveau "zéro". Nous avons suivi - dans le foie de truite mâle - la cinétique d'induction de l'ARNm Vg par hybridation avec l'ADNc Vg, après stimulation par  $E_2$  et (3) l'apparition de Vg dans le sérum en utilisant une technique de dosage original (rocket immuno-électrophorèse). Le modèle vitellogénine du foie de truite mâle et les techniques originales mises au point seront très précieuses pour étudier l'influence des facteurs endogènes et exogènes sur les différentes étapes (récepteurs, transcription, traduction) de la régulation de la synthèse de Vg.

A B S T R A C T.

In all egg laying vertebrates, synthesis and use of vitellogenin (Vg) are intimately bound to the active phase of reproduction. In the liver of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*), Vg synthesis is influenced by oestradiol ( $E_2$ ) which, we believe, acts through the classical mechanism of steroid hormone action. After binding of the hormone to a soluble specific receptor protein, the oestradiol-receptor complex is translocated to the nucleus, where it interacts with DNA and modulates expression of Vg genes, leading to increased synthesis of specific mRNA and Vg. We show here : (i) the presence of specific oestrogen receptors (dissociation constant  $K_D = 1.5 \times 10^{-9}M$  for  $E_2$ ) in the cytosol of the male trout liver. (ii) The male liver, offering, an ideal experimental control of "zero" background, we followed - in the liver of male trouts - the kinetics of induction of Vg mRNA by hybridization with Vg cDNA, after  $E_2$  stimulation, and (iii) the apparition of Vg in the serum by using an original rocket immuno-electrophoretic technique. The male trouts liver vitellogenin model and the original techniques we developed will be very useful to study the influence of endogenous and exogenous factors on the different steps (receptors, transcription, translation) of vitellogenesis regulation.

MOTS CLES : Vitellogénine, oestradiol, récepteurs, ARNm vitellogénine, truite.  
KEY WORDS : Vitellogénine, estradiol, receptors, mRNA vitellogenine, trout.

## I N T R O D U C T I O N .

Chez les vertébrés ovipares, les protéines du jaune d'oeuf sont synthétisées dans le foie sous forme d'une grosse molécule précurseur : la vitellogénine qui se scinde en phosvitine et lipovitelline après incorporation par les oocytes (Clemens 1974 ; Gruber et al 1976 ; Tata et Smith 1979 ; Wahli et al 1981).

La synthèse et l'utilisation de la vitellogénine sont des phénomènes intimement liés à la reproduction. Comme chez les autres vertébrés, la synthèse de vitellogénine chez les poissons est sous le contrôle direct des oestrogènes : oestradiol (Campbell et Idler 1976 ; Elliot et al 1979 ; Emmersen et Petersen 1976 ; Hara et Hirai 1978) et oestrone (Van Bohemen 1982 a, 1982 b). Cependant, à part les travaux de A.H. Roach et P.L. Davis (1980) sur le poisson-chat et, très récemment, ceux de Chen (1983) chez la truite arc-en-ciel, il n'existe guère de données sur les mécanismes moléculaires de la régulation de la synthèse de cette protéine chez les poissons.

L'objet de ce travail a été de montrer, à l'aide de techniques que nous avons mises au point ou adaptées (dosage de la vitellogénine et de son RNA messager), que les différentes étapes du mécanisme moléculaire d'activation des gènes de la vitellogénine : liaison de l'oestradiol à un récepteur spécifique, induction ou modification de l'expression des gènes conduisant à la synthèse de mRNA et de vitellogénine, étaient également présentes chez la truite arc-en-ciel.

## M A T E R I E L E T M E T H O D E S .

### *Animaux et produits chimiques.*

Les truites arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*) en provenance de la pisciculture de Gournay/Aronde (Oise) sont élevées dans les bassins du Laboratoire de Physiologie des Poissons (I.N.R.A. RENNES) dans un système d'eau recyclée (Petit et Ferron 1975) jusqu'à utilisation pour les expériences.

Les réactifs ont été obtenus chez les fournisseurs ci-après indiqués : 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>), oestrone (E<sub>1</sub>), oestriol (E<sub>3</sub>), diéthylstilbestrol (DES), 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT), 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -diol), bleu de Coomassie, bromure d'éthidium, ficoll, polyvinylpyrrolidone, serum albumin bovine (BSA) ADN de testicule de saumon (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, U.S.A.). Deoxyribonuclease I, ADN polymérase I, les 4 déoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et TTP (Boehringer Mannheim, R.F.A.). Déoxy(1',2',5-<sup>3</sup>H)cytidine 5' triphosphate 50 Ci/mmole, (méthyl 1',2'-<sup>3</sup>H)thymidine 5' triphosphate 109 Ci/mmole, (6,7-<sup>3</sup>H)17 $\beta$ -oestradiol 55 Ci/mmole (Amersham France SA).

### *Préparation du cytosol.*

Le cytosol a été préparé par homogénéisation du foie dans 4 ml de tampon I (20 mM Tris, 1,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) pH 7,4. L'homogénat a été centrifugé à 35 000xg à 0°C pendant 20 minutes et ensuite à 200 000xg à 0°C pendant 90 minutes.

### *Purification partielle des récepteurs.*

La précipitation fractionnée des protéines solubles a été réalisée sur une fraction de cytosol à des concentrations en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (AS) de 30 % et 50 % de sa-

turation. Une solution saturée de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le tampon I a été ajoutée goutte à goutte, avec agitation, à des fractions de cytosol. Après 30 minutes, la suspension a été centrifugée à 3 600xg pendant 10 minutes. Les culots AS 30 % et AS 50 % ont ensuite été dissous dans le tampon I.

#### *Mesure de la liaison de $^3\text{H}\text{-E}_2$ .*

Les constantes de dissociation ont été déterminées en ajoutant des concentrations croissantes ( $7,5 \times 10^{-10}\text{M}$  à  $5 \times 10^{-8}\text{M}$ ) de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  ± un excès (100 fois) de  $(^1\text{H})\text{-E}_2$ , à 75  $\mu\text{l}$  de cytosol brut ou de préparation partiellement purifiée de récepteurs. Le volume final de chaque essai a été ajusté à 250  $\mu\text{l}$ .

La spécificité de la liaison a été déterminée par addition de 75  $\mu\text{l}$  de cytosol brut à des fractions de 175  $\mu\text{l}$  de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  ( $3,78 \times 10^{-9}\text{M}$ ) contenant des concentrations croissantes de stéroïdes compétiteurs dans le tampon I.

Après incubation, pendant 3 h à 0°C, l'hormone radioactive liée aux récepteurs a été mesurée par addition de 25  $\mu\text{l}$  de charbon-dextran à 10 % (DCC) dans le tampon I, centrifugation à 3 600xg pendant 10 minutes à 0°C et comptage de 150  $\mu\text{l}$  de surnageant dans 10 ml d'ACS (Amersham). La liaison non spécifique a été déterminée par la quantité de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  liée en présence d'un excès de  $(^1\text{H})\text{-E}_2$ . Elle a été soustraite des autres valeurs pour obtenir la quantité de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  liée spécifiquement.

#### *Extraction des stéroïdes et chromatographie sur couche mince.*

Le cytosol incubé pendant 3 h à 0°C en présence de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  ( $5 \times 10^{-9}\text{M}$ ) a été extrait par 2 fois 5 volumes d'un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (1/1). Après centrifugation à 3 600xg pendant 10 minutes, la phase organique a été évaporée à sec. L'extrait sec a été repris par du méthanol contenant les stéroïdes témoins  $\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$  et  $\text{E}_3$  (1 mg/ml) et déposé sur plaque (20 x 20 cm) de gel de silice. La séparation des stéroïdes a alors été effectuée à température ambiante dans le système de solvants chloroforme-acétate d'éthyle (80/20). Après repérage de la position des stéroïdes témoins à 254 et 366 nm, le gel de silice a été gratté par fraction de 0,5 x 1 cm. Les stéroïdes ont alors été extraits de chaque fraction par 2 x 2 ml d'acétate d'éthyle, évaporés à sec, repris par 200  $\mu\text{l}$  de méthanol, et comptés dans 2 ml d'ACS.

#### *Extraction des ARN.*

Les foies des animaux sont prélevés rapidement, congelés dans l'azote liquide et stockés au congélateur à -80°C jusqu'à utilisation. L'ARN total est extrait par la technique d'Auffray et Rougeon (1980), modifiée par Tenniswood et Simpson (1982). L'ARN poly A<sup>+</sup> a été préparé par chromatographie sur oligo-dT cellulose d'après la technique d'Aviv et Leder (1972), avec un taux de récupération de 10 à 30  $\mu\text{g}$  d'ARN poly A<sup>+</sup> par mg d'ARN total (Valotaire et al 1983). Les préparations d'ARN sont analysées par électrophorèse sur plaque d'agarose à 1,2% dans des conditions dénaturantes (Mc Master et Carmichel 1977) pour s'assurer de la qualité des préparations. La concentration en ARN est déterminée sur une aliquote par mesure de l'absorption à 260 nm.

#### *Hybridation de l'ARN messager vitellogénine.*

Les ARN sont immobilisés par liaison covalente sur des filtres de papier traités à l'amino-thio-phénol et diazotés selon la technique décrite par Seed

(1982). Des aliquotes de 10 µl contenant 10 µg d'ARN total ou 5 à 10 ng d'ARN poly A<sup>+</sup> sont déposées sur les filtres et incubées 12 h entre 2 feuilles de parafilm scellées. Les hybridations sont ensuite réalisées dans les conditions décrites par Wahl et al (1979) puis les filtres sont brûlés dans un "auto-oxidizer" Packard Tricarb modèle 306, et la radioactivité déterminée par scintillation liquide au moyen d'un appareil Isocap 300 (Nuclear Chicago).

La sonde utilisée, préparée en collaboration avec M. Tenniswood, D. Bailey et J.R. Tata (National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres), est un plasmide PAT 153 dans lequel a été inséré un fragment de 0,6 Kb correspondant à une séquence de l'ARN messager de la vitellogénine (Tenniswood et al 1983). Cette sonde a été marquée par "nick translation" en utilisant les déoxynucléotides triphosphates tritiés. L'activité spécifique est comprise entre 7 et 12µCi/µg de DNA.

#### *Dosage de la vitellogénine.*

Le sang est prélevé chez les animaux en expérience par ponction dans la veine caudale à l'aide d'une seringue héparinée. Après 24 h de décantation, le sérum est obtenu par centrifugation à 2 000xg. Les échantillons sont ensuite stockés au congélateur à -20°C. Le taux de vitellogénine est déterminé par une technique d'immunoélectrophorèse que nous avons mise au point après préparation d'un anticorps spécifique (Y. Valotaire et al, soumis à publication). Les films de plastique (F.M.C. Gelbond films) sont découpés en carrés de 5 cm de côté. L'anticorps antivitellogénine est dilué au 1/400ème dans la solution d'agarose à 1 %. Après refroidissement de l'agarose, on réalise 12 puits de 2 mm de diamètre par succion de l'agarose à l'aide d'une aiguille reliée à une trompe à vide. Neuf échantillons de 2 µl peuvent ainsi être analysés par plaque de 5 cm de côté. Après électrophorèse (18 h à température ambiante, voltage constant = 2,3 mvolts/cm) les plaques sont lavées pendant 24 h dans le NaCl à 0,9 % et 1 h dans l'eau distillée. Elles sont ensuite séchées sur papier Whatman 3 MM à l'étuve à 40°C et colorées au bleu de Coomassie. La quantité de vitellogénine est déterminée par mesure de la hauteur du pic d'immunoprécipitation par comparaison avec des pics standards obtenus avec des quantités croissantes de vitellogénine purifiée (Valotaire et al, soumis à publication).

#### *Dosage de l'oestradiol.*

Il a été réalisé par Radio Immuno Assay (R.I.A.) au Laboratoire de Physiologie des Poissons (Breton et al 1983).

### R E S U L T A T S.

#### *Détermination des caractéristiques du récepteur soluble du 17β-oestradiol.*

L'incubation de (6,7-<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> ± un excès (100 fois) de (1H)-E<sub>2</sub> et de cytosol, à 0°C, permet de montrer une liaison spécifique du 17β-oestradiol dans le cytosol de foie de truite. Cette liaison est maximale dès 30 minutes et reste stable pendant au moins 24 heures (L. Dolo et L. Mercier, résultats non publiés).

La mesure des paramètres de liaison du 17β-oestradiol dans le cytosol a été effectuée après 3 heures d'incubation à 0°C. Dans ces conditions, on n'observe pas de transformation du (6,7-<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> (figure 1).

La constante de dissociation (K<sub>D</sub>) a été mesurée dans le cytosol brut et dans des préparations partiellement purifiées de récepteurs après précipitation par le sulfate d'ammonium (fractions AS 30 % et AS 50 %).

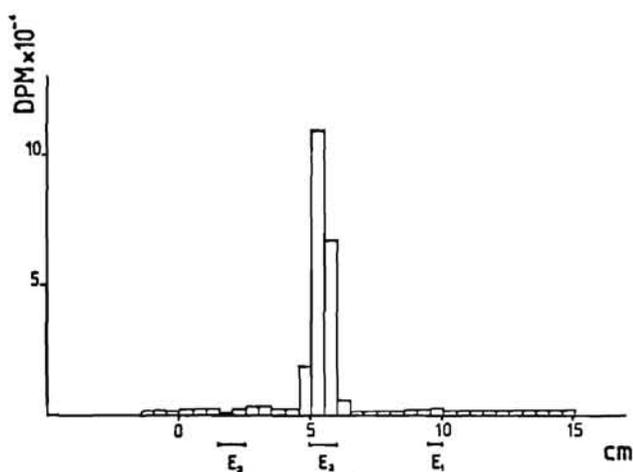


Fig. 1 - Séparation par chromatographie sur gel de silice, dans le système chloroforme-acétate d'éthyle (80/20), des stéroïdes extraits après incubation du cytosol pendant 3 h à 0°C, et présence de (6,7-<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> (5 × 10<sup>-9</sup>M). La position des stéroïdes témoins est indiquée par un trait plein situé sous l'axe des abscisses (E<sub>3</sub> = oestriol, E<sub>2</sub> = oestradiol, E<sub>1</sub> = oestrone).

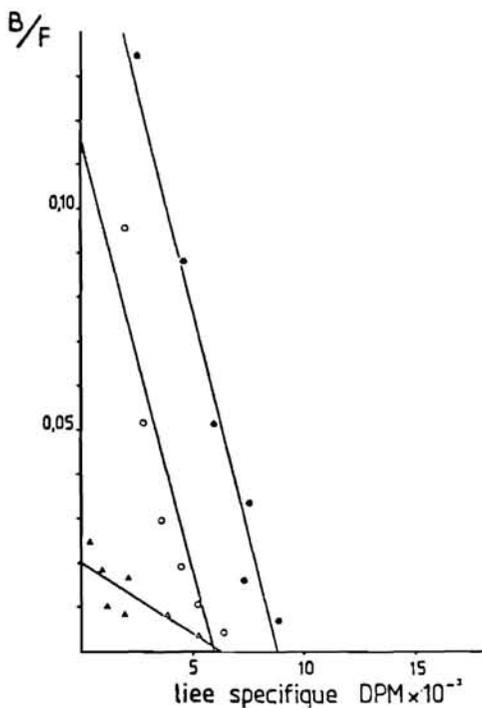


Fig. 2 - Représentation selon Scatchard de la liaison spécifique de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> dans le cytosol. Des fractions aliquotes de cytosol brut (●) ou de préparations partiellement purifiées de récepteur cytosolique - après précipitation fractionnée par (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - fraction AS 30 % (○) et AS 50 % (△) ont été incubées pendant 3 h à 0°C, en présence de concentrations croissantes (7,5 × 10<sup>-10</sup>M à 5 × 10<sup>-8</sup>M) de (<sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> ± un excès (100 fois) (<sup>1</sup>H)-E<sub>2</sub>. L'hormone radio-active liée a été déterminée après élimination de l'hormone libre par le DCC. Dans tous les cas, l'hormone spécifiquement liée a été déterminée par soustraction de l'hormone liée non spécifique à l'hormone liée totale.

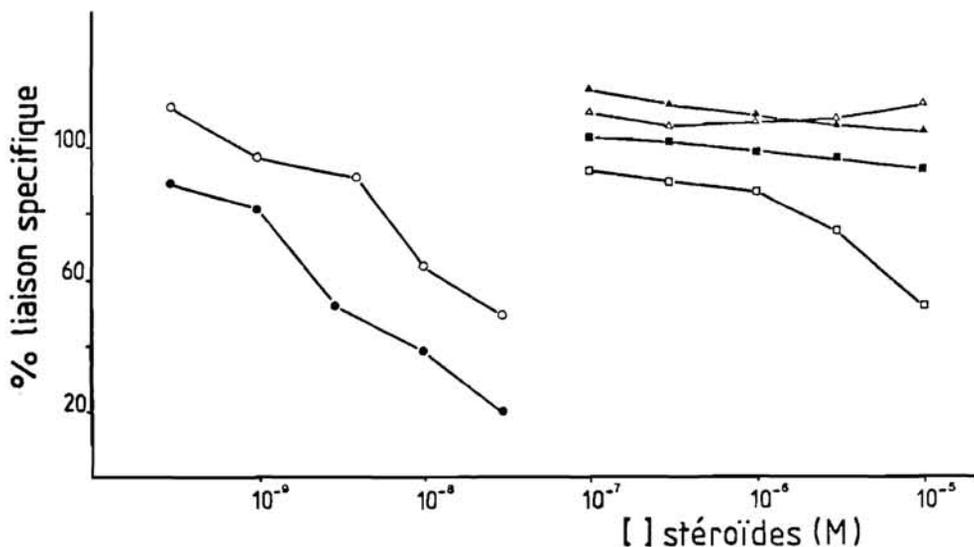


Fig. 3 - Compétition de  $(^1\text{H})\text{-E}_2$  (●), DES (○), 5 $\alpha$ -DHT (□), 3 $\beta$ -diol (■), progestérone (▲), dexaméthasone (△) sur la liaison de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  dans le cytosol. Des fractions de cytosol ont été incubées en présence de  $3,78 \times 10^{-9}\text{M}$  de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  et de concentrations croissantes des différents stéroïdes compétiteurs, pendant 3 h à 0°C. L'hormone radioactive liée a été mesurée après traitement des fractions par le DCC. La liaison non spécifique a été évaluée dans les mêmes conditions, en présence d'un excès (800 fois) de  $(^1\text{H})\text{-E}_2$ . La quantité de  $(^3\text{H})\text{-E}_2$  spécifiquement liée en présence des différents stéroïdes est représentée en % du contrôle sans compétiteur.

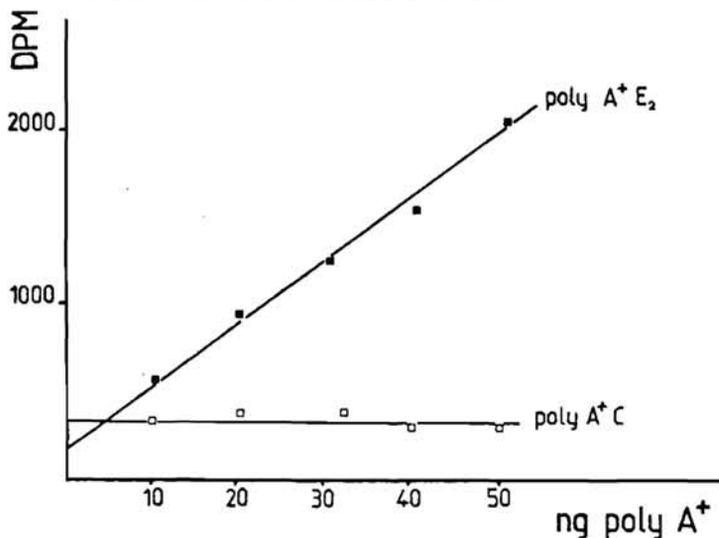


Fig. 4 - Hybridation des ARN poly A<sup>+</sup> de cruites mâles stimulées à l'oestradiol et contrôle (Protocole I). Des quantités croissantes de ARN poly A<sup>+</sup> ont été déposées (10 à 50 ng) sur des carrés de papier Whatman 540 activés à l' amino-thio-phénol et diazotés. Après hybridation avec une sonde marquée au tritium, les disques sont brûlés dans un "auto-oxidizer" (Packard Tricarb modèle 306) et la radioactivité déterminée par scintillation liquide dans un compteur Isocap 300 (Nuclear Chicago).  
 ■ - ARN poly A<sup>+</sup> d'animaux stimulés.  
 □ - ARN poly A<sup>+</sup> d'animaux témoins.

La représentation de Scatchard de la liaison du 17 $\beta$ -oestradiol dans le cytosol (figure 2) n'est pas toujours linéaire, indiquant la présence d'au moins 2 types de sites de liaison. Par contre, après précipitation par (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, i.e. après purification partielle, on retrouve dans la fraction AS 30 % un composant unique de haute affinité K<sub>D</sub> = 1,52 x 10<sup>-9</sup>M. On note également dans la fraction AS 50 % un autre composant d'affinité plus faible K<sub>D</sub> = 9,01 x 10<sup>-9</sup>M, mais en quantité variable d'un cytosol à l'autre, et pouvant affecter la linéarité du graphique de Scatchard dans le cytosol total pour les concentrations les plus élevées en hormone.

La figure 3 montre la spécificité étroite de la liaison du 17 $\beta$ -oestradiol. Parmi les stéroïdes utilisés, seuls les oestrogènes ( <sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub> et DES) sont des compétiteurs efficaces de ( <sup>3</sup>H)-E<sub>2</sub>. L'affinité relative du DES est toutefois plus faible (3 à 7 fois) que celle de E<sub>2</sub>. La 5 $\alpha$ -DHT est un compétiteur faible, tandis que le 3 $\beta$ -diol, la progestérone et la dexaméthasone ne sont pas compétiteurs.

#### *Induction de l'ARN messenger de la vitellogénine.*

Un groupe de 15 truites mâles de 200 g environ a été divisé en 2 lots : le premier lot a reçu par voie intrapéritonéale une solution saline d'oestradiol-17 $\beta$  à raison de 0,5 mg/kg de poids, le second recevant uniquement le solvant. Le même protocole a été répété tous les 2 jours pendant 5 jours et les animaux ont été sacrifiés le septième jour (protocole I). Les injections répétées permettent d'obtenir un pourcentage important de messenger spécifique.

La figure 4 représente les résultats de l'hybridation des ARN poly A<sup>+</sup> extraits des foies des 2 lots d'animaux et montre que uniquement les ARN poly A<sup>+</sup> purifiés à partir du groupe d'animaux stimulés sont capables de s'hybrider proportionnellement à la quantité d'ARN déposée sur les filtres. Des estimations semi-quantitatives après électrophorèse sur agarose 1,2 % ou hybridation en phase liquide nous avaient montré que l'ARN poly A<sup>+</sup> des animaux stimulés contenait environ 10 % de ARNm vitellogénine (Valotaire et al 1983). La quantité de ARNm détectable par la technique d'hybridation sur filtre serait donc de l'ordre de 1 ng, ce qui correspond à la sensibilité déterminée précédemment par P.F. Searle et al (1981) pour l'ARNm vitellogénine de Xénope.

#### *Cinétique d'induction de l'ARN messenger de la vitellogénine.*

15 truites mâles de 200 g environ reçoivent une seule dose d'oestradiol-17 $\beta$  (Protocole II) dans les mêmes conditions que précédemment. Les animaux sont ensuite sacrifiés en fonction du temps. 10  $\mu$ g de ARN total de chaque échantillon sont déposés sur les filtres et soumis à hybridation avec la sonde spécifique.

La figure 5 montre que l'induction de l'ARN messenger vitellogénine se produit après un temps de latence de 5 h et que le taux d'ARN est maximum 48 h après la stimulation. Cette quantité reste alors constante pendant 5 à 6 jours. 15 jours après l'injection, le taux de messenger a déjà très nettement diminué : il ne reste plus que 10 % de la quantité maximum induite.

#### *Détermination quantitative de la vitellogénine.*

La figure 6 représente une courbe standard de quantification de la vitellogénine par immunoélectrophorèse. Des quantités croissantes de vitellogénine purifiée (30 à 400 ng) sont déposées dans les puits et soumises à l'électrophorèse en présence d'anticorps. La photographie prise après coloration des pics d'immuno-précipitation montre que la hauteur des pics (exprimée en mm) est directement proportionnelle à la quantité de vitellogénine déposée. La limite inférieure du dosage dans le sérum de truite est de 10  $\mu$ g/ml.

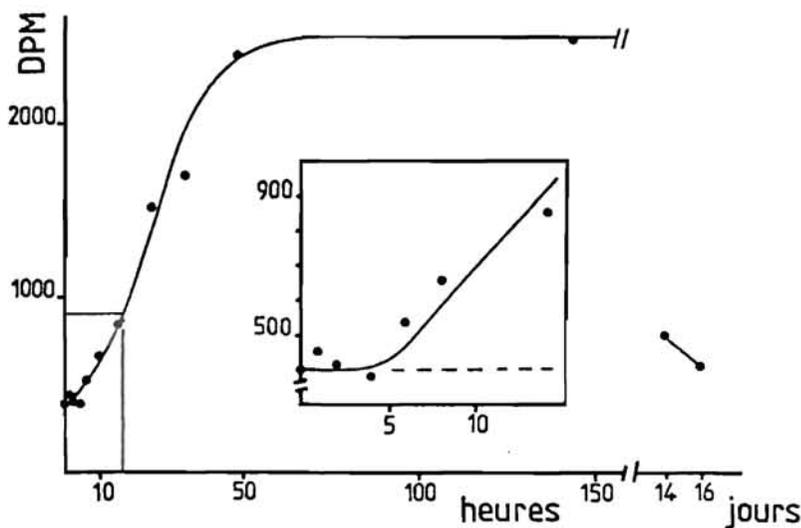


Fig. 5 - Cinétique d'apparition de l'ARN messager de la vitellogénine après stimulation à l'oestradiol-17 $\beta$ .

Un lot de 15 truites mâles de 200 g environ a été stimulé par injection intrapéritonéale d'une solution d'oestradiol-17 $\beta$  à raison de 0,5 mg/kg de poids (Protocole II). Les animaux ont été sacrifiés à des temps variables. 10  $\mu$ g de ARN total ont été déposés sur les filtres et la radioactivité correspondant à l'hybridation déterminée comme précédemment. L'encadré correspond aux temps brefs de stimulation.

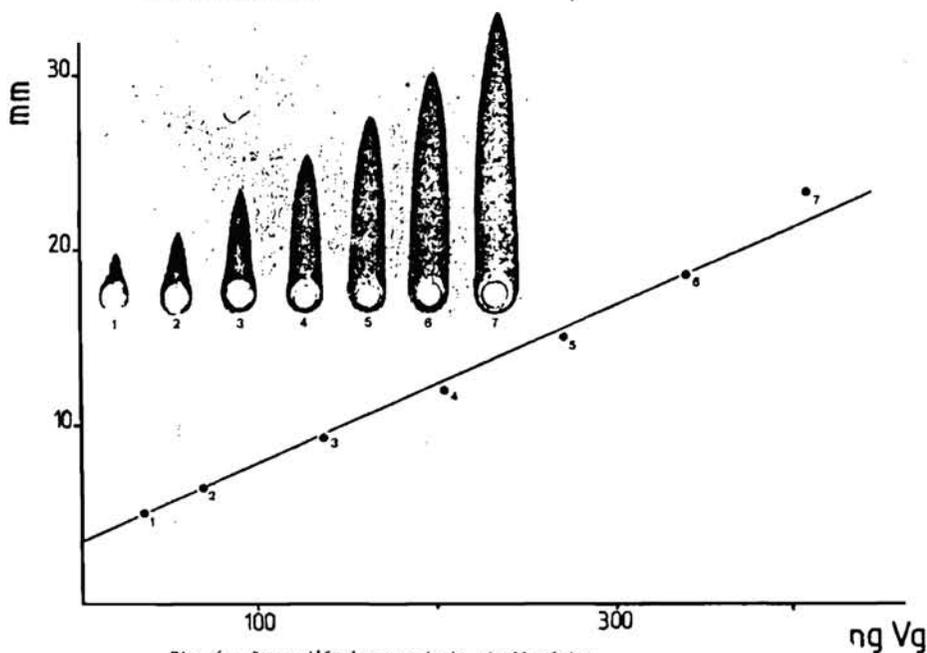


Fig. 6 - Gamme d'étalonnage de la vitellogénine.

Des quantités croissantes de vitellogénine de 34 à 408 ng ont été déposées dans les puits du gel d'agarose à 0,1 % contenant l'anticorps antivitellogénine dilué au 1/400 $^{\text{ème}}$ . La migration s'effectue sous 2,3 mv/cm pendant 18 h. Après séchage et coloration des plaques, les pics d'immuno-précipitation sont mesurés et la hauteur en mm est reportée en fonction de la quantité de Vg exprimée en ng.

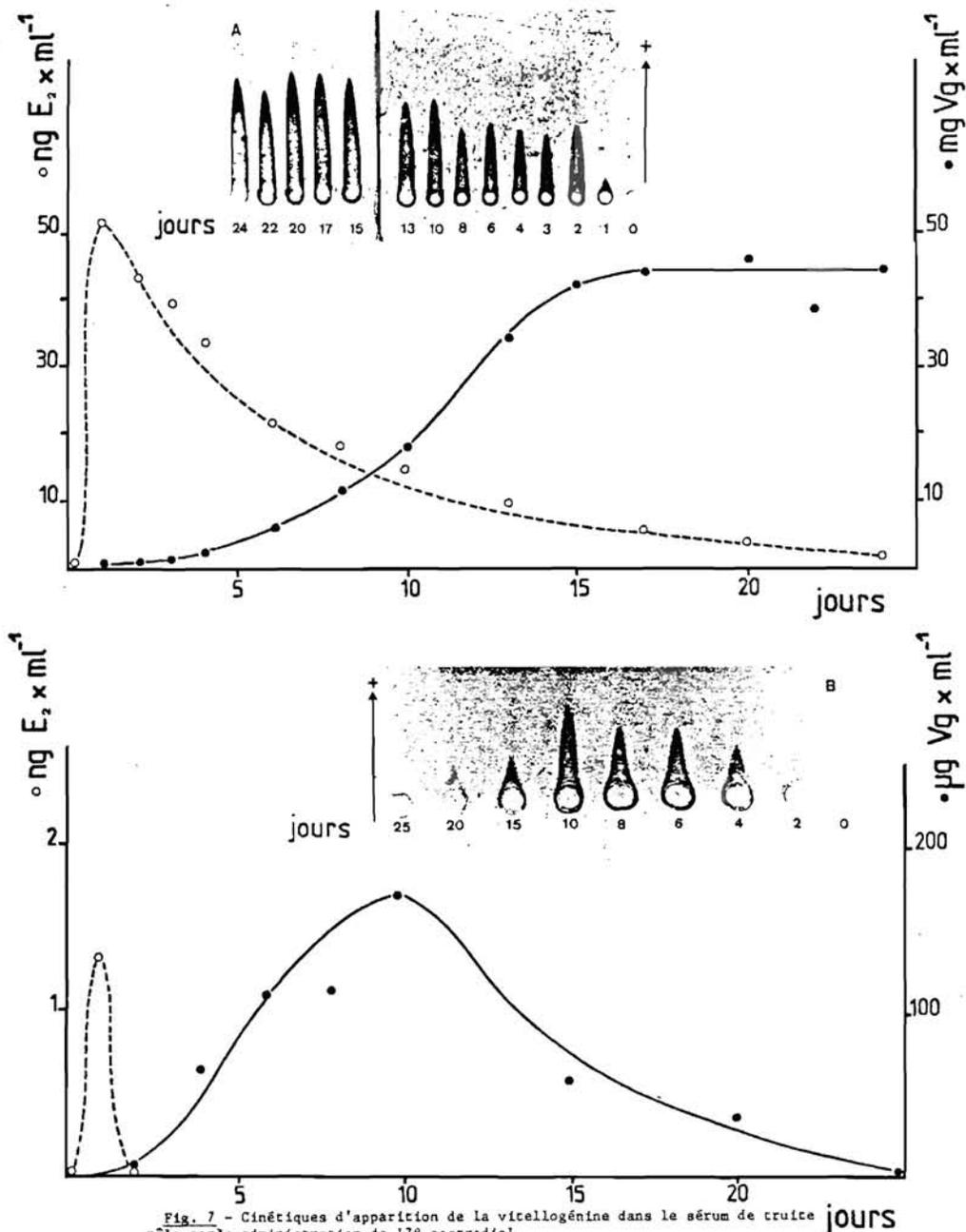


Fig. 7 - Cinétiques d'apparition de la vitellogénine dans le sérum de truite mâle après administration de 17 $\beta$ -oestradiol.

Le taux de vitellogénine dans le sérum a été déterminé par immuno-électrophorèse en utilisant de la vitellogénine purifiée comme étalon (voir fig. 6). Différentes dilutions de sérum ont été utilisées. -○- oestradiol. -●- vitellogénine.

7 A : Stimulation avec un implant d'oestradiol de 3 mg/ml. Aux jours de stimulation indiqués, les dilutions suivantes du sérum ont été effectuées pour le dosage : 0, 1, 2 (1/4) - 3 (1/10) - 4 (1/20) - 6 (1/50) - 8, 10 (1/100) - 13 à 24 (1/200).

7 B : Stimulation avec un implant d'oestradiol de 0,05 mg/ml. Tous les sérums ont été dilués au 1/2 avant dosage.

### *Cinétiques d'induction de la vitellogénine.*

Afin de pouvoir prélever du sang tous les jours au début de l'induction, la stimulation a été effectuée chez des animaux d'un poids voisin de 1 kg (truite A 1,2 kg - truite B 0,8 kg), le 17 $\beta$ -oestradiol a été dissous dans le beurre de cacao à 40°C et injecté par voie intrapéritonéale de façon à produire un implant après solidification du beurre de cacao (truite A 3 mg d'oestradiol pour 1 ml de beurre de cacao - truite B 0,05 mg pour 1 ml de beurre de cacao). La concentration du serum en oestradiol a été mesurée par Radio Immuno Assay (R.I.A.). La figure 7 A montre que l'apparition d'E<sub>2</sub> dans le sérum est rapide chez la truite A et que sa concentration est du même ordre de grandeur que celle retrouvée chez les femelles en vitellogénèse (> à 10 ng/ml, Breton et al 1983). On observe une diminution régulière du taux d'oestradiol pendant une période de 25 jours. Chez la truite B (fig. 7 B) la concentration en oestradiol retrouvée dans le sérum est très faible. La seule mesure positive a été réalisée au lendemain de l'injection. La concentration en E<sub>2</sub> était alors de 1 ng/ml. Cette concentration est inférieure à celle de truite femelle en prévitellogénèse (Breton et al 1983). Les cinétiques d'apparition de la vitellogénine chez les 2 animaux sont quantitativement très différentes. Chez la truite A (fig. 7 A) la vitellogénine est détectable dans le sérum après 24 h de stimulation et la concentration augmente régulièrement pour atteindre un plateau au 15<sup>ème</sup> jour. La vitellogénine représente alors plus de la moitié des protéines totales. On peut également observer que ce plateau est stable au moins jusqu'au 25<sup>ème</sup> jour, bien que la concentration en oestradiol dans le sérum soit considérablement réduite. Chez la truite B (fig. 7 B) la concentration en vitellogénine du sérum est très basse, le maximum étant environ 500 fois plus faible que chez la truite A. La technique d'immuno-électrophorèse utilisée nous permet néanmoins de suivre la cinétique d'apparition de la vitellogénine avec précision et montre que des concentrations d'oestradiol de l'ordre du ng/ml de sérum sont suffisantes pour induire la synthèse de la protéine.

### D I S C U S S I O N.

Nos résultats apportent la preuve de la présence de récepteurs de l'oestradiol dans le foie de truite mâle dans des conditions (incubation du cytosol à 0°C) où l'hormone n'est pas métabolisée.

2 types de sites ont été mis en évidence : les uns de haute affinité  $K_D = 1,55 \times 10^{-9}M$ , les autres d'affinité plus faible  $K_D = 6,79 \times 10^{-9}M$  (moyenne de 2 expériences). Ces 2 composants peuvent être séparés par précipitation fractionnée par  $(NH_4)_2SO_4$ . La présence du 2<sup>nd</sup> composant de faible affinité n'est pas systématique dans toutes les préparations de cytosol : parfois indétectable dans le cytosol brut, comme sur la fig. 2, parfois en quantité telle que les représentations de Scatchard se résolvent en 2 droites. La signification de ce deuxième type de site n'est pas facile à définir. Il pourrait s'agir d'une protéine "inusuelle" liant les stéroïdes sexuels, comme celle décrite par Dickson et al (1978) dans le foie de rat mâle, voire de protéine plasmatique. Il ne faut pas perdre de vue que le foie est le site de synthèse de protéines plasmatiques et que le taux de synthèse est susceptible de varier en fonction de l'état physiologique de l'animal. Les préparations de cytosol utilisées ne provenant pas d'animaux dans le même état physiologique (âge différent, animaux spermiant ou non), on peut penser qu'il y a là une explication à la variation du taux de ce second composant. Quand le cytosol ne contient qu'un seul composant de haute affinité, la constante de dissociation mesurée est identique à celle mesurée dans la fraction AS 30 %.

La spécificité de la liaison hormonale est très étroite puisque seuls les oestrogènes E<sub>2</sub>, DES, E<sub>1</sub> et E<sub>3</sub> (résultats non représentés) sont compétitifs. Contrairement à ce qui a été observé dans d'autres systèmes : foie de mammifère (Chamness et al 1975 ; Duffy and Duffy 1977), hypophyse antérieure de mammifère (Thieulant et Pelletier 1980 ; Thieulant et al 1981) ; foie de poisson (Le Menn et al 1980 ; Turner et al 1981), l'affinité relative du DES est ici en moyenne 3 à 7 fois plus faible que celle de E<sub>2</sub>. Le DES est un composé de synthèse qui ne se lie pas ou avec une faible affinité à la "sex hormone binding globulin" (SHBG) (Raynaud et al 1972). On pourrait donc s'interroger sur la signification de l'affinité plus faible du DES pour les sites de liaison de E<sub>2</sub> dans le cytosol de foie de truite. Ces sites de liaison de haute affinité sont-ils caractéristiques des récepteurs spécifiques ou seraient-ils dus à une contamination par la SHBG ? Cette dernière hypothèse paraît cependant peu vraisemblable. En effet, la SHBG a également été décrite chez la raie, *Raja radiata* (Freeman and Idler 1969 ; Idler et Freeman 1969), chez la roussette *Scyliorhinus canicula* (Martin 1975), chez l'aiguillat commun, *Squalus acanthias* (Ho et al 1980). Ces auteurs la décrivent comme une protéine liant les stéroïdes à 18 (androgènes), à 19 (oestrogènes), 21 (corticostéroïdes et progestérone) atomes de carbone avec une haute affinité. Chez la truite, *Salmo gairdnerii*, Fostier et Breton (1975) ont aussi décrit la présence de protéines plasmatiques liant les stéroïdes sexuels et les corticostéroïdes.

La spécificité étroite des sites de liaison pour les seuls oestrogènes (compétition très faible avec la 5 $\alpha$ -DHT, aucune compétition avec le 3 $\beta$ -diol, la progestérone et la dexaméthasone) semble devoir écarter l'idée que ces sites seraient dus à une contamination par des protéines plasmatiques dont la spécificité est au contraire très large.

En utilisant des préparations d'hépatocytes fraîchement isolés par perfusion du foie à la collagénase, nous avons pu montrer que les caractéristiques des récepteurs de E<sub>2</sub> étaient identiques à celles du foie (K<sub>D</sub> = 1,5 x 10<sup>-9</sup>M) (résultats non publiés). Nous tentons maintenant de démontrer que les caractéristiques des récepteurs sont aussi conservées dans des hépatocytes isolés maintenus en culture primaire et que dans ces conditions où le taux d'E<sub>2</sub> est bien contrôlé, il existe une corrélation étroite entre le nombre de sites de liaison occupés, le taux d'ARN messager de la vitellogénine et le taux de vitellogénine synthétisée.

La présence d'ARN messager spécifique de la vitellogénine n'a pu être mise en évidence chez la truite mâle qu'après stimulation à l'oestradiol. Chez les animaux témoins, même en augmentant les quantités d'ARN poly A<sup>+</sup> de 5 à 50 ng, nous n'avons jamais pu obtenir d'hybridation moléculaire avec la sonde spécifique. Ce résultat consolide les observations précédentes (Valotaire et al 1983; Chen 1983). La truite arc-en-ciel peut donc également constituer un excellent modèle pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes sous contrôle hormonal. En effet, l'oestradiol active un gène normalement silencieux chez le mâle, ce qui est assez inhabituel dans la plupart des modèles étudiés actuellement. Nous montrons également que la cinétique d'induction, comme chez d'autres espèces : Xénope, poulet (Ryffel 1978 ; Westley 1979), ne démarre qu'après un temps de latence de 4 à 5 h (encadré fig. 5). Ce temps de latence, plus ou moins long suivant les espèces, pourrait être dû à la synthèse de récepteurs spécifiques qui persisteraient à un niveau élevé, même après disparition de l'oestradiol injecté (Westley et Knowland 1979 ; Wright et al 1983).

En ce qui concerne les cinétiques d'apparition de la vitellogénine, les implants d'oestradiol utilisés délivrent dans le sérum des taux d'hormone comparables à ceux retrouvés chez la femelle au cours du cycle normal. On peut ainsi montrer que des concentrations d'oestradiol aussi faibles que 1 ng/ml de sérum sont capables d'induire la synthèse de vitellogénine chez le mâle, et on peut se demander si, chez la femelle, la synthèse de vitellogénine ne commence pas plus tôt qu'on ne le pense au cours du cycle annuel.

Ces expériences préliminaires avaient surtout pour but de préparer l'arsenal technologique nécessaire à l'étude de l'expression génétique de la vitellogénine chez la truite arc-en-ciel. Nous envisageons maintenant d'aborder des problèmes plus physiologiques. *In vivo* l'étude comparée des cinétiques de vitellogénèse (récepteurs, ARN messenger, vitellogénine), chez les 3 souches de *Salmo gairdnerii* qui pondent à des dates différentes, devrait nous permettre de savoir si le déclenchement du phénomène est synchrone avec modulation ultérieure de la vitesse de synthèse de vitellogénine ou si ces déclenchements sont décalés dans le temps et les vitesses de synthèse identiques.

Au cours du cycle normal, le déclenchement de la vitellogénèse est lié à l'élévation du taux d'oestradiol du sérum (Van Bohemen et al 1982 a, 1982 b ; Breton et al 1983). Parallèlement, il apparaît des taux d'oestrone importants. Le rôle de cette hormone dans la vitellogénèse a été mis en évidence par Van Bohemen (1982 a, 1982 b). Nous espérons obtenir des renseignements plus précis sur son mode d'action en déterminant son impact dans les différentes étapes de la régulation.

Enfin, à l'aide d'un système d'hépatocytes isolés que nous avons mis au point (résultats non publiés), nous espérons pouvoir tester *in vitro* un certain nombre de facteurs endogènes (hormones) et exogènes, antibiotiques, herbicides, pesticides pouvant avoir une influence sur la production de vitellogénine.

Nous remercions le Dr Fostier (Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A. RENNES) pour les dosages d'oestradiol.

- 
- AUFFRAY, Ch. and ROUGEON, F. : Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA.  
Eur. J. Biochem., 1980, 107, 303-314.
- AVIV, M. and LEDER P. : Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1408-1412.
- BRETON, B. ; FOSTIER, A. ; ZOHAR, Y. ; LE BAIL, P.Y. et BILLARD, R. : Gonadotropine glycoprotéique maturante et oestradiol-17 $\beta$  pendant le cycle reproducteur chez la truite Fario (*Salmo trutta*) femelle.  
Gen. Comp. Endocrinol., 1983, 49, 220-231.
- CAMPBELL, C.M. and IDLER, D.R. : Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum).  
Gen. Comp. Endocrinol., 1976, 28, 143-150.
- CHAMNESS, G.C. ; COSTLOW, M.E. and Mc GUIRE, W.L. : Estrogen receptor in rat liver and its dependence on prolactin.  
Steroids, 1975, 26, 363-371.
- CHEN, T.T. : Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout.  
Canad. J. of Biochem. and Cell Biol., 1983, 61, 802-810.
- CLEMENS, M.J. : The regulation of egg yolk protein synthesis by steroid hormones.  
Prog. Biophys. Mol. Biol., 1974, 28, 69-107.

- DICKSON, R.B. ; ATEN, R.F. and EISENFELD, A.J. : An unusual sex steroid binding protein in mature male rat liver cytosol. *Endocrinology*, 1978, 103, 1636-1646.
- DUFFY, M.J. and DUFFY, G.J. : Estradiol receptors in human liver. *J. Steroid Biochem.*, 1978, 9, 233-235.
- ELLIOT, J.A.K.; BROMAGE, N.R. and WHITEHEAD, C. : Effects of estradiol-17 $\beta$  on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. *J. Endocrinol.*, 1979, 83, 54-55.
- EMMERSEN, B.K. and PETERSEN, I.M. : Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17 $\beta$  of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1976, 54B, 443-446.
- FREEMAN, H.C. and IDLER, D.R. : Sex hormone binding proteins. II. Isolation from serum of an elasmobranch (*Raja radiata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1969, 13, 83-91.
- FOSTIER, A. and BRETON, B. : Binding of steroids by plasma of a Teleost : The rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *J. Steroid Biochem.*, 1975, 6, 345-351.
- GRUBER, M. ; BOS, E.S. and AB, G. : Hormonal control of vitellogenin synthesis in avian liver. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1976, 5, 41-50.
- HARA, A. and HIRAI, H. : Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1978, 59B, 339-343.
- HO, S.M. ; TSANG, P. and CALLARD, I.P. : Some properties of a steroid-binding protein in the plasma of an ovoviparous dogfish, *Squalus acanthius*, at different stages of the life cycle. *Biol. Reprod.*, 1980, 23, 281-289.
- HORI, S.M. ; HODAMA, T. and TANAHASHI, K. : Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1979, 37, 306-320.
- IDLER, D.R. and FREEMAN, H.C. : Sex hormone binding proteins. I. Binding of steroids by serum of an elasmobranch (*Raja radiata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1969, 13, 75-82.
- LE MENN, F. : Some aspects of vitellogenin in a teleostean fish : *Gobius niger* L. *Comp. Gen. Biochem. Physiol.*, 1979, 62A, 495-500.
- LE MENN, F. ; ROCHEFORT, H. and GARCIA, M. : Effects of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver : vitellogenin accumulation. *Steroids*, 1980, 35, 315-328.
- MAC MASTER, G.K. and CARMICHAEL, G.C. : Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 4835-4838.

- MARTIN, B. : Steroid protein interaction in non mammalian vertebrates. I. Elasmobranch steroids-binding (E. SBP) in dogfish serum (*Scyliorhinus canicula*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1975, 25, 42-51.
- PETIT, J. et FERRON, J.L. : Les problèmes de l'eau en pisciculture. I. Le recyclage. *La Pisciculture française*, 1975, 42, 18-23.
- RAYNAUD, J.P. ; MERCIER-BODARD, C. and BAULIEU, E.E. : Rat estradiol binding plasma protein. *Steroids*, 1972, 18, 767-788.
- ROACH, A.H. and DAVIES, P.L. : Catfish vitellogenin and its messenger RNA are smaller than their chicken and *Xenopus* counterparts. *Biochimica Biophysica Acta*, 1980, 610, 400-412.
- RYFFEL, G.U. : Synthesis of vitellogenin, and attractive model for investigating hormone-induced gene activation. *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1978, 12, 237-246.
- SEARLE, P.F. and TATA, J.R. : Vitellogenin gene expression in male *Xenopus* hepatocytes during primary and secondary stimulation with estrogen in cell cultures. *Cell*, 1981, 23, 741-746.
- SEED, B. : Diazotable arylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, 1799.
- TATA, J.R. and SMITH, D.F. : Vitellogenesis : a versatile model for hormonal regulation of gene expression. *Recent Progress in Hormone Research*, 1979, 35, 47-90.
- TENNISWOOD, M. ; BAILEY, D. ; VALOTAIRE, Y. and TATA, J.R. : Gene expression in trout (*Salmo gairdnerii*) during vitellogenesis. *Communication à Canadian Federation of Biological Society* (Juin 1983).
- TENNISWOOD, M. and SIMPSON, A.J.G. : The extraction, characterization and in vitro translation of RNA from adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 1982, 27, 84-89.
- THIEULANT, M-L., SAMPEREZ, S. and JOUAN, P. : Evidence for 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol binding to the estrogen receptor in the cytosol from male rat pituitary. *Endocrinology*, 1981, 108, 1552-1560.
- THIEULANT, M-L. and PELLETIER, J. : Evidence for androgen and estrogen receptors in castrated rat pituitary cytosol : influence of time after castration. *J. Steroid Biochem.*, 1980, 10, 677-687.
- TURNER, R.T. ; DICKHOFF, W.W. and GORBMAN, A. : Estrogen binding to hepatic nuclei of pacific hagfish *Eptatretus stouti*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1981, 45, 26-29.
- VALOTAIRE, Y. ; TENNISWOOD, M. ; LE GUELLEC, C. and TATA, J.R. : The preparation and characterization of vitellogenin messenger RNA from rainbow trout. *Biochem. J.* (sous presse).
- VAN BOHEMEN, Ch.G. ; LAMBERT, J.G.D. ; GOOS, H.J.T. and VAN OORDT, P.G.W.J. : Estrogene and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo Gairdnerii*. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, 1982 a, 46, 81-92.

- VAN BOHEMEN, Ch.G. ; LAMBERT, J.G.D. and VAN OORDT, P.G.W.J. : Vitellogenin induction by estradiol in estrone-primed rainbow trout, *Salmo gairdnerii*.  
Gen. and Comp. Endocrinol., 1982 b, 46, 136-139.
- WAHL, G.M. ; STERN, M. and STARK, G.R. : Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 3683-3687.
- WAHLI, W. ; DAWID, I.B. ; RYFFEL, G.U. and WEBER, R. : Vitellogenesis and the vitellogenin gene family.  
Science, 1981, 212, 298-304.
- WESTLEY, B. : The relationship of the estrogen receptor to the induction of vitellogenin in chicken and *Xenopus* liver.  
Differentiation, 1979, 15, 67-72.
- WESTLEY, B. and KNOWLAND, I. : Estrogen causes a rapid, large and prolonged rise in the level of nuclear estrogen receptor in *Xenopus laevis* liver.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, 88, 1167-1172.
- WRIGHT, Ch.V.E. ; WRIGHT, S.C. and KNOWLAND, J. : Partial purification of estradiol receptor from *Xenopus laevis* liver and levels of receptor in relation to estradiol concentration.  
E.M.B.O. J., 1983, 2, 973-977.
- YU, J.Y.L. ; DICKHOFF, W.W. ; SWANSON, P. and GORBMAN, A. : Vitellogenesis and its hormonal regulation in the pacific hagfish *Eptatretus stouti* L.  
Gen. and Comp. Endocrinol., 1981, 43, 492-502.