

MISE EN EVIDENCE DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES α et β dans les OVAIRES de *BOULENGERULA TAITANUS* AMPHIBIEN GYMNOPHIONE

* Michel RAQUET¹, John MEASEY², Jean-Marie EXBRAYAT¹

* mraquet@univ-catholyon.fr

¹ Université de Lyon, UMRS 449, Laboratoire de Biologie Générale, UCLy; Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, EPHE, 25 rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02.

² DST-NRF Centre of Excellence for Invasion Biology, Faculty of Science, Stellenbosch University, Private Bag XI, Matieland 7602, South Africa

INTRODUCTION

Les amphibiens gymnophiones sont des animaux allongés et fouisseurs vivant dans les zones tropicales dont la biologie de la reproduction a fait l'objet de travaux portant sur un nombre limité d'espèces [1-7]. Peu d'entre eux ont été consacrés aux aspects hormonaux [8-11]. Le but de ce travail est d'apporter quelques éléments à la connaissance de la régulation endocrinienne du cycle de reproduction chez une espèce africaine ovipare à développement direct par la mise en évidence des récepteurs α et β des œstrogènes.

Boulengerula taitanus est un amphibien gymnophione ovipare dont l'adulte mesure 20 à 25 cm de longueur, vivant dans les terrains humides des monts Taïta au Kenya. Le cycle femelle peut être décomposé en trois périodes : reproduction de novembre à février, repos sexuel de

mars à août et préparation de septembre à octobre. Les ovaires se présentent comme deux cordons parallèles situés de part et d'autre du tube digestif. Les follicules sont disposés en chapelets. La folliculogenèse est continue. Les follicules se forment dans des nids germinatifs où les jeunes ovocytes issus des ovogonies s'entourent progressivement d'une paroi folliculaire composée d'abord d'une seule couche de cellules épithéliales constituant une granulosa puis d'une thèque conjonctive. Les follicules vitellogéniques font saillie et avoisinent les 8 mm de diamètre. La thèque s'épaissit et se vascularise, la granulosa reste monostratifiée et les cellules deviennent cubiques à maturité. L'ovulation est observée entre novembre et février inclus. Toute l'année, sont observés des follicules atrétiques de grande taille issus des follicules vitellogéniques n'ayant pas ovulé [12].

Le 17β œstradiol est une hormone œstrogène ovarienne impliquée, avec la progestérone, dans la régulation de la croissance folliculaire et l'ovulation. La détection immunohistochimique des isoformes α et β du récepteur des œstrogènes (RE) a été effectuée au niveau de l'ovaire de *B. taitanus*.

MATERIEL ET METHODES

L'échantillon comprenait les ovaires gauches de trois femelles adultes par saison de reproduction, fixées au formaldéhyde à 10 % immédiatement après collecte *in situ*. Les ovaires, déshydratés puis inclus en paraffine ont été débités en coupes longitudinales de 7 μm d'épaisseur ensuite déposées sur des lames « superfrost+ »[®], au nombre de trois au minimum, avant d'être traitées par immunohistochimie indirecte par amplification. Un démasquage préalable a été réalisé au bain-marie pendant 45 minutes dans une solution tampon à pH 6 (VECTOR H-3300). Les peroxydases internes ont été neutralisées par immersion dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 % pendant 10 mn. Les anticorps primaires ont été dirigés contre le récepteur α et le récepteur β (Santa Cruz, sc-72074 et sc-8975 respectivement). La concentration choisie après étalonnage a été de 1/50. Le kit Vectastain (VECTOR laboratories ABC KIT PK-6200) a été ensuite utilisé pour l'application de l'anticorps secondaire biotinylé. Le temps de révélation en présence du substrat chromogène, AEC ou amino-éthyl carbazol, a été de 5 mn. La révélation a été effectuée par le système avidine-biotine couplé à une peroxydase. Une contre-coloration à l'hématoxyline (Vector

QS H-3401) a été effectuée avant montage en milieu aqueux. Un témoin négatif, sans anticorps primaire, a été confectionné pour chaque lame.

Les coupes traitées ont été observées au microscope photonique. Pour chaque tissu ovarien, un comptage de noyaux marqués a été effectué. Une analyse statistique a permis de comparer les variances (test de Fisher) entre les saisons (N= 6) et sur l'ensemble de l'année (N= 9) au seuil de 0,05.

RESULTATS

Les témoins ne présentent aucun marquage, quelles que soient les saisons et quels que soient les tissus observés.

L'observation au microscope photonique des coupes d'ovaires en période de reproduction, révèle un marquage positif au niveau des noyaux, suite à l'application de l'anticorps dirigé contre le RE α . Ce pourcentage est de 14,4 % pour les cellules conjonctives des nids germinatifs (Figure 1). Dans la paroi des follicules en croissance le pourcentage de noyaux marqués est de 13 % dans la thèque et de 3,6 % dans la granulosa. Il augmente fortement en vitellogenèse : 29,9 % pour la thèque et 42,2 % pour la granulosa (Figure 1). Dans les follicules atrétiqes, les noyaux de 26,4 %, des cellules de la paroi possèdent un marquage, ce qui est comparable à ce qui a été trouvé dans les cellules de la thèque des follicules en vitellogenèse, au contraire des cellules issues de la granulosa dans lesquelles le pourcentage devient plus faible : 11,7 % contre 3,6 % dans les cellules de la granulosa des follicules en vitellogenèse (Figure 1).

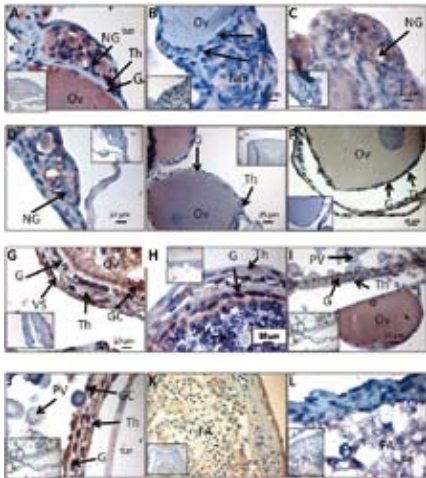


Figure 1 : détection immunohistochimique du RE α et du RE β dans l'ovaire de *B. taitanus*. Echelle = 10 μ m.

A : nid germinatif, RE α , reproduction, février ;
 B : nid germinatif, RE α , repos sexuel, mars ;
 C : nid germinatif, RE β , reproduction, février ;
 D : nid germinatif, RE β , repos sexuel, juin ;
 E : follicule en croissance, RE α , repos sexuel, juin ;
 F : follicule en croissance, RE β , repos sexuel, juin ;
 G : follicule vitellogénique, RE α , reproduction, janvier ;
 H : follicule vitellogénique, RE β , reproduction, février ;
 I : follicule vitellogénique, RE α , préparation, septembre ;
 J : follicule vitellogénique, RE β , préparation, septembre ;
 K : follicule atrétique, RE α , reproduction, janvier ;
 L : follicule atrétique, RE β , reproduction, février.
 FA : follicules atrétiques ;
 G : granulosa ; GC : granules corticaux ; NG : nid germinatif ; Ov : ovocyte ; PV : plaquette vitelline ; Th : thèque ; VS : vaisseau sanguin.

Concernant la détection du RE β , les noyaux de 19,5% des cellules conjonctives du stroma des nids germinatifs sont marqués, la paroi folliculaire des follicules en croissance ne présente par contre aucun marquage (Figure 1). Un signal nucléaire positif réapparaît dans les cellules de la granulosa des follicules en vitellogenèse et atrétiques, avec 43,9% et 41,7% des noyaux marqués respectivement (Figures 1 et 2).

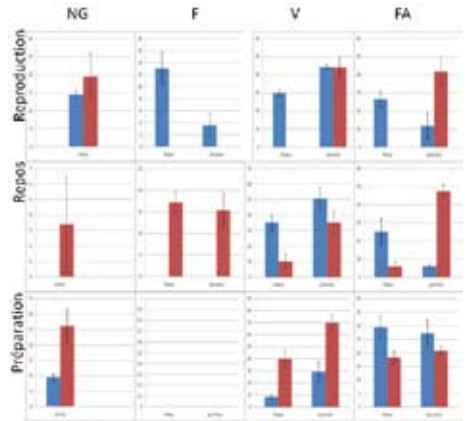


Figure 2 : évolution du pourcentage de noyaux marqués pour le RE α et le RE β dans l'ovaire de *B. taitanus* au cours des trois saisons.

NG = nids germinatifs
 F = follicules en croissance
 V = follicules vitellogéniques
 FA = follicules atrétiques
 En bleu : RE α
 En rouge : RE β
 La barre d'erreur correspond aux écarts-types.

En période de repos sexuel, c'est-à-dire entre mars et août, aucun RE α n'est détecté dans la paroi des follicules en croissance, des follicules vitellogéniques et des follicules atrétiques. La présence du RE β affecte 3,4% des noyaux du stroma des nids germinatifs, 17,2% des noyaux de la thèque et 15,4% des noyaux de la granulosa (Figure 1). Dans les follicules vitellogéniques, les cellules de la thèque présentent rarement des noyaux marqués par l'anticorps dirigé contre le RE β , le pourcentage de marquage des cellules de la granulosa est un peu inférieur à celui de la saison de reproduction (35,1%). Aucun changement n'est enregistré au niveau des follicules atrétiques (Figure 2).

Concernant la détection des RE α , l'analyse statistique des résultats comparant la saison de reproduction à celle du repos sexuel montre que les variations du pourcentage de noyaux marqués sont significatives au seuil de 0,05. Deux exceptions sont à relever : la granulosa des follicules vitellogéniques et la paroi entière des follicules atreétiques pour lesquelles les variations ne sont pas significatives entre les saisons. Quant à la détection des RE β nucléaires, la non-significativité a été enregistrée uniquement pour la paroi des follicules vitellogéniques et celles de follicules atreétiques.

Pendant la saison de préparation à la reproduction, en septembre-octobre, le signal nucléaire des RE α réapparaît dans 9,5 %, des cellules du stroma des nids germinatifs. Aucun signal n'est observé dans la paroi des follicules en croissance. En revanche, le pourcentage de noyaux marqués diminue dans la paroi des follicules vitellogéniques : 8,3 % et 29,4 % pour la thèque et la granulosa respectivement (Figure 1). Le pourcentage de noyaux marqués augmente fortement dans les cellules issues de la granulosa des follicules atreétiques (27,2 %).

Des RE β nucléaires sont observés dans 26,1 %, des cellules du stroma des nids germinatifs mais aucun marquage n'est observé dans la paroi des follicules en croissance. Dans les follicules vitellogéniques, le pourcentage de noyaux marqués augmente fortement dans la thèque et la granulosa avec désormais 39,9 % et 69,9 % des noyaux marqués respectivement (Figure 1); cette augmentation n'est suivie

dans les follicules atreétiques que par les cellules issues de la thèque, avec 18,3 % des noyaux marqués (Figure 2).

L'analyse statistique concernant la détection des RE α nucléaires révèle que les résultats sont significativement différents entre la saison précédente du repos sexuel et celle de la préparation, excepté pour la granulosa des follicules vitellogéniques et les cellules issues de la thèque dans les follicules atreétiques. Pour ce qui est de la détection des RE β nucléaires, la non-significativité a été relevée uniquement pour les cellules issues de la thèque dans les follicules atreétiques.

Sur l'ensemble de l'année, les variations dans les comptages sont toutes significatives au seuil de 0,05 pour l'ensemble des tissus ovariens, excepté pour la granulosa des follicules vitellogéniques (RE α), et les cellules issues de la thèque des follicules atreétiques (RE α et RE β).

CONCLUSION

La détection des deux isoformes du RE au niveau nucléaire montre que les cellules somatiques ovariennes sont la cible du 17 β œstradiol produit par la granulosa (action auto- et paracrine). Mais le pourcentage de noyaux possédant un signal positif est différent pour les anticorps dirigés contre le RE α et le RE β . La balance des RE α / β varie ainsi selon les types de tissus ovariens : les RE β nucléaires prédominent dans le stroma des nids germinatifs et les cellules internes des follicules atreétiques. Les RE α nucléaires prédominent dans les cellules thécales des follicules en crois-

sance et vitellogéniques, les cellules de la paroi des follicules atrétiques. La balance des RE α / β nucléaires s'équilibre dans la granulosa des follicules en croissance et vitellogéniques.

Cette balance RE α / β évolue également au cours du cycle sexuel. En saison de repos sexuel, elle devient presque nulle dans les nids germinatifs, s'inverse dans la thèque et la granulosa des follicules en croissance au profit du RE β . En revanche, elle ne varie pas dans la paroi des follicules vitellogéniques et des follicules atrétiques. Lors de la saison de préparation, la balance RE α / β se rétablit pour les nids germinatifs, devient nulle pour les follicules en croissance, et s'inverse dans la paroi des follicules vitellogéniques et les cellules issues de la granulosa des follicules atrétiques au profit des RE β .

L'évolution significative du taux de marquage nucléaire au cours du cycle va dans le sens d'une modulation de l'expression des deux isoformes du récepteur des œstrogènes selon le type cellulaire et le moment du cycle ovarien. Les résultats concernant les nids germinatifs et la paroi des follicules en croissance pendant la saison de repos suggèrent une régulation de la folliculogénèse en lien avec la disparition des RE α . La reprise en saison de préparation semble liée à la forte augmentation des RE β dans les nids germinatifs.

L'existence d'une absence significative de variation dans la détection des isoformes nucléaires dans les cellules issues de la thèque des follicules atrétiques suggère que, pour ces tissus, il n'existe pas de variation dans la régulation endocrine du 17 β œstradiol. En revanche, pour la granulosa des follicules vitellogéniques, les variations saisonnières sont observées au niveau de la détection des RE β nucléaires. Ces faits suggèrent l'existence: 1) d'un lien entre la détection du RE α et le maintien de la vitellogenèse chez *Boulengerula taitanus* tout au long de l'année; 2) d'un rôle du RE β dans la modulation saisonnière du développement de la granulosa, spécialement à l'approche de la période d'ovulation.

Même si le récepteur peut être localisé dans le noyau sans être lié à son ligand, comme pour le RE α , sa détection immunohistochimique va dans le sens d'une action génomique différenciée du 17 β œstradiol en rapport avec la proportion des isoformes du récepteur présents dans le noyau des cellules [13]. Cela rejoint les études antérieures sur le rôle propre des isoformes du RE chez les mammifères, permettant de rendre compte de l'effet pléiotrope du 17 β œstradiol [14].

BIBLIOGRAPHIE

1. EXBRAYAT J.M. et ESTABEL J. Anatomy with particular reference to the reproductive system. In Exbrayat J; -M. (ed). Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers Inc., Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 79-155.
2. EXBRAYAT J.-M. Oogenesis and folliculogenesis In Exbrayat J; -M. (ed). Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers Inc., Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 275-290.
3. BEYO R.S., SREEJITH P., DIVYA L., OOMMEN O.V., AKBARSHA M.A. Assembly of ovarian follicles in the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: light and transmission electron microscopic study. Zygote, 2007, 15 (3): 199-213.
4. BEYO R.S., SREEJITH P., DIVYA L., OOMMEN O.V., AKBARSHA M.A. Ultrastructural observations of previtellogenic ovarian follicles of the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*. J. Morphol., 2007, 268 (4): 329-42.
5. BEYO R.S., DIVYA L., SMITA M., OOMMEN O.V., AKBARSHA M.A. Stages in follicle cell/oocyte interface during vitellogenesis in caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: a transmission electron-microscopic study. Cell Tissue Res., 2008, 331 (2): 519-528.
6. KUPFER A., NABHITABHATA J., HIMSTEDT W. Reproductive ecology of female caecilian amphibians (genus *Ichthyophis*): a baseline study. Biol. J. Linn. 2004, 83: 207-217.
7. KUPFER A., KRAMER A., HIMSTEDT W., GREVEN H. Copulation and egg retention in an oviparous Caecilian (Amphibia: Gymnophiona) Zoologischer Anzeiger, 2006, 244: 223-228.
8. EXBRAYAT J.-M. et COLLENOT G. Quelques aspects de l'ovaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Batracien Apode vivipare. Repr. Nutr. Dév., 1983, 23(5), 889-898.
9. EXBRAYAT, J.-M. Reproduction et organes endocrines chez les femelles d'un Amphibien Gymnophione vivipare, *Typhlonectes compressicaudus*, Bull. Soc. Herp. Fr., 1992, 64, 37-50.

10. EXBRAYAT J-M. Endocrinology of reproduction. In Exbrayat J;-M. (ed). Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Vol. 5 of series edited by B.G.M. Jamieson, Science Publishers Inc., Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 183-229.
11. GOMES A.D. NAVASA C. A., JARED C., ANTONIAZZI M.M., CEBALLOS N.R., MOREIRAA R.G. Metabolic and endocrine changes during the reproductive cycle of dermatophagic caecilians in captivity. *Zoology*, 2013, 116: 277– 285.
12. RAQUET M., MEASEY J. et EXBRAYAT J.M. Premières observations histologiques de l’ovaire de *Boulengerula taitanus*, Loveridge, 1935, Amphibien Gymnophione. *Rev. fr. histotechnol*, 2007, 19 (1), 9-15.
13. KING, W. J., GREENE, G. L. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*. 1984, 307 (5953), 745-747.
14. PAECH, K., WEBB, P., KUIPER, G.G., et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*, 1997 - 277 (5331), 1508-1510.