



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles (SIReNa)

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA)

THESE

Présentée à l'Université de Lorraine pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline : Sciences Agronomiques

Présentée et soutenue publiquement par

Jennifer ROCHE

Le 19/11/2018

**Implication des récepteurs de la dopamine dans la régulation de l'axe
gonadotrope lors de la période pré-ovulatoire chez le sandre,
*Sander lucioperca***

Composition du jury :

Rapporteurs	Sylvie Dufour	Directrice de Recherche CNRS MNHN, Paris
	Hervé Migaud	Professeur des Universités Université de Stirling, Ecosse
Examineurs	Elisabeth Pellegrini	Maître de Conférences Université de Rennes 1
	Pascal Sourdain	Professeur des Universités Université de Caen Normandie
Directeur de thèse	Pascal Fontaine	Professeur des Universités Université de Lorraine, Nancy
Co-directeur de thèse	Sylvain Milla	Maître de Conférences Université de Lorraine, Nancy

REMERCIEMENTS

Remercier.

Quiconque est reconnaissant est heureux. Mais comment remercier sans n'oublier personne ? Je ne vois qu'une solution, commencer par dire un GRAND MERCI à tout le monde.

Merci à mon CO-directeur Sylvain qui m'a choisi pour cette thèse et cru en moi tout au long de celle-ci. Merci d'avoir été présent deux minutes, une heure ou bien plus pour répondre à mes nombreuses interrogations et remises en question. Mais également merci pour les bons moments de détente et de rigolades que nous avons pu avoir par téléphone ou les pieds dans la boue, sous la pluie à la Bouzule. Toutes les relations doctorant-encadrant ne se passent pas comme je l'ai vécu et je te remercie pour ça.

Bien sûr, je ne peux pas oublier Pascal, mon directeur de thèse « officiel », comme le dirait une certaine personne dont je tairais le nom. Le premier jour où je t'ai rencontré, le jour de mon entretien de thèse, j'étais impressionnée et inquiète. Tu jouais le méchant et Sylvain le gentil. Aujourd'hui, j'éprouve un grand respect envers le scientifique mais également la personne que tu es. Je souhaite donc te remercier pour m'avoir permis d'intégrer ton équipe mais également et surtout pour tous les conseils sages et pertinents dont tu as le secret et que tu as partagés avec moi. Par contre, et j'espère que tu me pardonneras, mais je m'abstiendrai de suivre tes conseils sur la pratique du bowling que tu partageais pourtant avec beaucoup de passion.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury, Mme Sylvie Dufour, Directrice de recherche au Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) et M. Hervé Migaud, Professeur à l'Université de Stirling, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse mais également Mme Elisabeth Pellegrini, Maître de conférences à l'Université de Rennes et M. Pascal Sourdain, Professeur à l'Université de Caen d'avoir accepté d'en être examinateurs. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir dans mon jury et de bénéficier de vos conseils et de votre expérience.

Tout particulièrement, je tiens à remercier tous les membres de mon comité de suivi de thèse, M. Patrick Kestemont, Professeur à l'Université de Namur, Mme Céline Zatylny-Gaudin, Maître de conférences à l'Université de Caen, Mme Karine Rousseau, Maître de conférences au MNHN et M. Henri Schroeder, Maître de conférences à l'Université de Lorraine. Sans eux,

REMERCIEMENTS

mon projet de recherche n'aurait pas été celui qu'il est aujourd'hui. Leur regard critique, leurs conseils ainsi que leurs recommandations m'ont permis d'avancer et d'obtenir un certain nombre de résultats.

Bien entendu, je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire UR AFPA pour son accueil et son aide lors de mes nombreuses venues sur le site de l'ENSAIA. Que cela soit pour des démarches administratives, des besoins en matériel ou un simple problème d'entrée dans le bâtiment. Je ne pourrais bien sûr pas citer tout le monde, mais je tiens à remercier chaleureusement Cath, Claire, Mathieu, Pamela et l'ensemble des doctorants auxquels je souhaite du courage et beaucoup de réussite pour leur thèse.

Pour l'équipe DAC, mon équipe de recherche et d'accueil MERCI. Merci pour ces quatre années passées avec vous. Merci à Dominique, pour m'avoir permis de connaître l'enseignement. Merci à Bérénice pour les échanges partagés. Les si bons fruits de ton jardin me manqueront. A Fabrice, la personne qu'on reconnaît lors de son passage éclair dans le couloir, toujours speed mais qui a réussi à m'apporter un conseil me permettant d'avancer, merci. Bien sûr merci à Daniel et Joëlle pour les discussions et bons moments passés. Joëlle, comment je m'appelle déjà ? Je suis sûre que tu t'en souviens bien sûr ! Bien évidemment je tiens à remercier Marielle pour sa bienveillance maternelle, son aide lorsque j'en ai eu besoin que ce soit au début de ma thèse lors de mes expériences, ou encore à la fin pour obtenir cette salle de pot de thèse. Merci Marielle ! Pour Thomas, que dire ? Merci d'être toi, vrai, franc et honnête. Tu sais plaisanter mais tu sais être sérieux et pour ces bons moments de fous rires merci. Je souhaiterais également remercier Alain. Toutes nos discussions statistiques me manqueront. Mais qui ai-je pu oublier ???? PATRICIA !!! Mais non je pense à toi et tiens à te remercier également. J'ai appris à te connaître, tu as ta carapace mais au fond, tu es tendre et n'aime pas l'injustice. Je te remercie d'avoir été là quand j'en avais besoin et te souhaite beaucoup de bonheur. Yan, toi, tout seul avec tes poissons, c'est lors de notre pause déjeuner dans la salle café que nous avons pu le plus partager. Tes merveilleuses photos, tes petits carpaccios de poissons, nos discussions endiablées, que de bons moments. Merci.

Enfin, quelle serait l'équipe DAC sans ses doctorants, post-doctorants et stagiaires. Tous ses bons moments passés dans la salle café pour déjeuner, je ne les oublierais pas. Je ne pourrais

REMERCIEMENTS

pas nommer tous les stagiaires que j'ai rencontré au travers de cette thèse et avec qui j'ai passé de très bons moments, la liste est longue mais merci d'avoir été vous. J'aurais quand même une pensée particulière pour mes stagiaires Coralie, Amandine et Marie qui m'ont aidé à mener à bien mon projet de thèse. Coralie, bon courage pour ta fin de thèse. Pauline, Charlie que devenez-vous ? J'espère que vous avez réussi à trouver votre voie. Iris, bon courage pour tes milliards d'échantillons et surtout éclate toi.

Enfin, et oui on y arrive. La famille des doctorants (anciens et nouveaux) qui sont devenus plus que des collègues mais des ami(e)s. Je vous remercie pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de cette thèse. Merci pour tous nos moments partagés, au laboratoire, à l'extérieur... mais chut il ne faut pas trop en dire. Hâte qu'on se retrouve tous pour réitérer ces soirées bières, rigolades et autres !!!! Emilie, quand tu es partie je me suis sentie bien seule. Finis les déjeuners à l'extérieur pour évacuer la pression. Finies nos longues discussions où nous refaisons le monde. Mais merci d'avoir été là. Brian, bien que je donne peu de nouvelles, je pense à toi, à ta maladresse naturelle, à ta joie de vivre et à ta façon de profiter de la vie sans te prendre la tête. Merci de m'avoir bien fait rire. Maud, quand on ne te connaît pas on se demande ce que tu penses. Quand on te connaît, on sait que tu as le cœur sur la main et que tu donnes à ceux que tu aimes. Je voulais te remercier pour nos moments d'échanges, ton aide lorsque j'en ai eu besoin, pour m'avoir fait découvrir l'élevage larvaire dans le froid... Atchoum !!!! Ca y est je suis de nouveau malade. Que de souvenirs !!!! Merci aussi à Taina, très discrète mais tellement prête à aider quand il faut. Merci. Et Sonia (notre post-doctorante, la dernière arrivée), bien que nous ayons passé peu de temps ensemble, nous avons tout de suite pu discuter comme si on se connaissait depuis des lustres. Merci de m'avoir rassuré et encouragé.

Enfin, que serais-je devenu cette dernière année sans Imen, Lola et Tatiana. Merci à vous trois pour m'avoir supporté lors de cette fin de thèse et bien avant. Merci de m'avoir aidé, relu, conseillé, fait picoler, bien manger et j'en passe. Merci pour ces bons moments passés. Imen, tu es partie en Belgique mais tu es restée disponible pour moi à tout moment. Tu as toujours été une mère pour moi, voulant donner ce que tu n'as pas. Merci d'avoir été là. Lola, ma lolita, tu me manquesssss !!!! Je suis partie du bureau mais ma porte est toujours grande ouverte. Fais attention à toi. Je serais toujours là si tu as besoin. N'hésite pas. Tatiana, ces derniers temps nous nous sommes beaucoup rapprochées. J'aime nos conversations interminables qui font hurler Geoffrey et bien sûr nos repas improvisés au dernier moment. Je voulais te remercier.

REMERCIEMENTS

Sans toi, je n'aurais sans doute pas réussi à finir dans les temps ce manuscrit. Merci beaucoup. A très vite sur Rennes ! Bien sûr, je n'oublie pas JB, François, Carlos. Merci à tous les trois d'être vous.

Une thèse c'est long et court en même temps, c'est riche en émotions heureuses et moins heureuses. C'est beaucoup de sacrifices pour quelque chose qui en vaut le coup. Comment aurais-je survécu à cette étape importante de ma vie sans mes amis, mais également sans ma famille. Merci à mes parents qui m'ont toujours poussé à continuer ; qui m'ont appris à être persévérante, et à finir tout ce que j'entreprends. Merci à ma maman qui m'a accompagné jusqu'au bout, qui était disponible pour chaque relecture, chaque déprime. Merci à mes sœurs, mes beaux-frères, et mes cinq rayons de soleil, Mia, Naëlle, Luna, Elyne et Marylou. Vous m'avez fait changer d'air, rire, relativiser et bien d'autres choses. Merci à tous.

Je souhaite également remercier ma belle-famille, Christine, Daniel, Aurélie, Morgan, les petits-loups mais également beaucoup d'autres, Marianne, Daniel qui ont toujours demandé des nouvelles sans vouloir me déranger. Merci à tous.

Pour finir cette liste qui pourrait ne jamais prendre fin, je tiens à remercier M. Geoffrey Dudal, l'amour de ma vie. Ces moments de thèse ont été parfois compliqués et longs mais tu as été là jusqu'au bout. Tu m'as aidé à tenir la distance même quand je ne voyais plus qu'un gouffre sans fond. Merci de ta patience. Merci d'avoir déménagé pour me suivre. Merci d'être là tous les jours. Ta patience a payé, nous allons bientôt pouvoir commencer notre nouvelle vie avec nos nouveaux projets.

Pour les personnes que j'aurais pu oublier, je les remercie toutes du fond du cœur.

Pour conclure, je tiens à dédier cette thèse à mes grands-parents sans qui je n'en serais pas là et qui je l'espère restent fiers de moi.

AVANT-PROPOS



Cette thèse a été co-financée par la région Lorraine et le projet européen eurostars (E! 9390 TRANSANDER) qui regroupe quatre partenaires, l'entreprise aquacole Asialor (France), l'Université de Lorraine (France), l'entreprise aquacole BMT Invest Kft. (Hongrie) et la Szent István University (Hongrie).

L'objectif principal de ce projet est l'optimisation de la reproduction du sandre. Il se divise en trois parties :

1. Une première partie qui cherche à améliorer un programme photo-thermique pour contrôler l'ensemble du cycle de reproduction afin d'obtenir les meilleures performances de reproduction.
2. **Une deuxième partie qui cherche à développer un protocole d'induction hormonal de la reproduction en se focalisant sur l'induction des phases finales de la gamétogenèse.**
3. Une troisième partie qui cherche à comparer les performances zootechniques entre des populations d'origines différentes en vue de choisir les meilleurs géniteurs de sandre pour de futurs programmes d'élevage.

Ma thèse s'intègre dans la deuxième partie de ce projet.

RESUME

Implication des récepteurs de la dopamine dans la régulation de l'axe gonadotrope en période pré-ovulatoire chez le sandre, *Sander lucioperca*

Dans le cadre de la production de nouvelles espèces aquacoles, le sandre, *Sander lucioperca*, est devenu, depuis plusieurs années, une espèce d'intérêt piscicole en raison de sa valeur économique potentielle. Pour développer et pérenniser sa production aquacole, il est nécessaire de comprendre et maîtriser son cycle de reproduction ainsi que les mécanismes physiologiques mis en jeu afin d'obtenir des œufs et des juvéniles viables tout au long de l'année. Dans cet optique d'optimisation du contrôle du cycle, la dopamine apparaît, chez de nombreux téléostéens dont certains perciformes, comme un inhibiteur de l'axe gonadotrope, via les récepteurs de la famille D₂, en bloquant le pulse ovulatoire de LH et l'ovulation. Chez le sandre, le rôle de la dopamine et de ses récepteurs, notamment les récepteurs de la famille D₁, est inconnu. L'objet de cette thèse est de déterminer le rôle du système dopaminergique lors des phases finales de l'ovogénèse chez le sandre à travers trois axes principaux : (1) déterminer l'effet du blocage des récepteurs de la dopamine, D₁ ou D₂, sur la régulation de l'axe gonadotrope et l'induction de l'ovulation en absence et en présence d'une molécule de sGnRHa, (2) définir le répertoire et le profil d'expression des récepteurs dopaminergiques par l'étude du transcriptome cérébral du sandre en période pré-ovulatoire et (3) établir le rôle de la dopamine et de ses différents récepteurs (familles D₁ et D₂) dans la régulation directe et locale de l'axe gonadotrope aux niveaux cérébral et ovarien.

La première partie de ce travail a permis pour la première fois, par l'utilisation d'antagonistes spécifiques des familles de récepteurs D₁ et D₂, de mettre en évidence un rôle potentiel de la dopamine sur la sécrétion de certains stéroïdes sexuels en période pré-ovulatoire chez le sandre par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₁. L'identification de l'ensemble des récepteurs de la dopamine existant chez le sandre nous a permis de confirmer leur expression à tous les niveaux de l'axe gonadotrope (cerveau, hypophyse et ovaires) étayant l'hypothèse d'un rôle de la dopamine dans la reproduction du sandre. Enfin, la dernière partie de ce projet a permis de montrer un rôle régulateur du système dopaminergique, directement au niveau ovarien, sur la production de testostérone par l'intermédiaire des deux familles de récepteurs de la dopamine. L'implication des deux familles de récepteurs a également été mise en évidence dans la production ovarienne de la 17 β -estradiol. Au niveau cérébral, seule la famille des récepteurs D₂ a été montrée impliquée dans la régulation de l'expression du gène de la GnRH-3. De façon générale, cette étude a permis de mettre en évidence l'implication des

RESUME

récepteurs de la dopamine dans la régulation de l'axe gonadotrope lors des phases finales de l'ovogenèse. Toutefois, des travaux ultérieurs devront être menés pour approfondir les mécanismes physiologiques mis en jeu. D'un point de vue aquacole, les traitements hormonaux à base d'antagonistes des récepteurs de la dopamine ont été inefficaces pour améliorer les performances de reproduction du sandre ce qui n'est pas en faveur de leur utilisation future pour induire l'ovulation chez cette espèce. Ainsi, la mise au point d'autres méthodes d'optimisation sera nécessaire pour continuer à développer la production aquacole du sandre.

Mots clefs : Dopamine, récepteurs dopaminergiques, sandre, ovulation, stéroïdes sexuels

ABSTRACT

Dopamine receptors involvement in the regulation of the gonadotropic axis during the pre-ovulatory period in pikeperch, *Sander lucioperca*

Pikeperch, *Sander lucioperca*, is a potential valuable economic fish, making it a species of interest for aquaculture diversification. In the domestication process, controlling and understanding the reproductive cycle is a crucial step in order to produce viable offspring in a synchronous and predictable way. In many teleosts including some perciforms, dopamine inhibits the ovulatory pulse of LH and the ovulation step through D₂ dopamine receptors family. In pikeperch, the roles of dopamine and its receptors, especially those belonging to the D₁ receptors family, are unknown. For the purpose of the optimization of pikeperch reproduction, we investigated the role of the dopaminergic system during the final stages of oogenesis in this species: (1) by determining the effects of D₁ or D₂ receptor antagonists alone or in association with sGnRH α on the regulation of the reproductive axis and on the induction of ovulation, (2) by determining the repertoire and the expression profile of the dopamine receptors using a brain transcriptome analysis during the pre-ovulatory period and (3) by evaluating the role of dopamine and its receptors (D₁ and D₂ families) in the direct and local regulation of the gonadotropic axis at the brain and ovarian levels.

For the first time, we showed that the dopamine/D₁ receptors complex regulates the sex-steroids release during the pre-ovulatory period, suggesting that dopamine is involved in pikeperch reproduction. Also, we support its involvement thanks to the identification of the dopamine receptors gene expression at the brain, pituitary and ovarian levels. Finally, we showed that the dopaminergic system directly regulates the ovarian testosterone production, through both D₁ and D₂ receptor families. The involvement of both dopamine receptor families was also highlighted on ovarian 17 β -estradiol production. Only the D₂ receptor family was shown to be involved on the brain GnRH-3 gene expression. In conclusion, we point out a dopamine receptors implication on the gonadotropic axis regulation during the final stages of oogenesis in pikeperch. However, further studies should be performed to pinpoint the physiological mechanisms behind this phenomenon. From an aquaculture point of view, hormonal treatments with dopamine receptor antagonists appear to be ineffective to improve pikeperch reproductive performances. Therefore, their use to induce pikeperch ovulation should be put into question and the development of alternative methods is necessary to further promote pikeperch production.

Keywords: Dopamine, dopamine receptors, pikeperch, ovulation, sex-steroids

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Cette liste comprend l'ensemble des abréviations citées dans l'introduction, la discussion et la conclusion de ce manuscrit (par ordre alphabétique).

Abréviations	Significations
11KT	11 KétoTestostérone
11 β -HSD	11 β -hydroxysteroid deshydrogenase
17, 20 β P ou DHP	17 α , 20 β dihydroxy-4-pregnen-3-one
20 β -HSD	20 β -hydroxysteroid deshydrogenase
20 β -S	17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one
3R	3ème duplication du génôme des téléostéens
3 β -HSD	3 β -hydroxysteroid deshydrogenase
AA	Acide Arachidonique
AADC	L-amino acide décarboxylase (ou DOPA décarboxylase)
AC	Adénylate Cyclase
ADAM 22	A Disintegrin And Metalloproteinases 22
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
BMP 15	Bone Morphogenetic Protein 15
CAM	Calmodulines
CCK	Cholécystokinine
cdc2	Cyclin-dependent protein kinase Cdk1 2
COMT	Catéchol-O-Méthyl Transférase
DA	Dopamine
DAG	Diacylglycérol
DAT	Dopamine transportor
DOC	11-déoxycorticostérone
DOM	Dompéridone
DOPAC	Acide dihydroxyphénylacétique
E ₂	17 β -Estradiol
EGF	Epidermal Growth Factor
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GABA	γ -aminobutyric acid
GAD67	Glutamate Décarboxylase 67
GAP	GnRH-Associated Peptide
GnIH	Gonadotropin Inhibitory Hormone
GnIHR	Récepteur de la GnIH
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GnRH _a	Analogue de la GnRH
GtH	Gonadotropin Hormone
GVBD	Germinal Vesicle BreakDown

GLOSSAIRE

Abréviations	Significations
hCG	human Chorionic Gonadotropin
IGF	Insulin-Growth Factor
InsP	Inositol trisphosphate
Kiss1r	Récepteur du Kisspeptine 1
L-DOPA	L-dihydroxyphénylalanine
LH	Luteinizing Hormone
MAO	Monoamine Oxydase
MCP	Métoclopramide
MIS	Maturation-Induced-Steroid
MPF	Maturation Promoting Factor
mPRs	Récepteurs membranaires des progestagènes
NE	Noradrénaline/Norépinéphrine
NMDA	N-Méthyl-D, L-Aspartic acid
NPOav	Noyau pré-optique antéro-ventral
NPY	Neuropeptide Y
P45011 β	P450 11 β hydroxylase
P450arom	P450 aromatasase
P450c17	Cytochrome P450 17-hydroxylase
P450scc	P450 side-chain cleavage
PI3kinase	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate kinase
PIM	Pimozide
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
RCPG	G Protein-Coupled Receptor
RGS	Rapport Gonado-Somatique
SCH	SCH23390
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
T	Testostérone
TGF β	Transforming Growth Factor β
TH	Tyrosine Hydroxylase
VSCC	Voltage Sensitive Calcium Channels

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
AVANT-PROPOS	5
RESUME	6
ABSTRACT.....	8
GLOSSAIRE.....	9
TABLE DES MATIERES	12
INTRODUCTION GENERALE	16
ETAT DE L'ART	21
1. Le modèle biologique : le sandre, <i>Sander lucioperca</i>	22
1.1. Présentation générale de l'espèce	22
1.2. La reproduction, le développement et l'environnement du sandre en conditions naturelles.....	23
2. La reproduction chez les femelles de poissons téléostéens	25
2.1. Le cycle de reproduction.....	25
2.1.1. Les phases d'initiation et de vitellogenèse	25
2.1.1.1. La phase d'initiation	25
2.1.1.2. Stade alvéole corticale et vitellogenèse	26
2.1.2. Les phases finales de l'ovogenèse.....	26
2.1.2.1. La maturation méiotique ovocytaire.....	27
2.1.2.2. L'ovulation.....	28
2.2. Le contrôle neuroendocrinien de la reproduction	29
2.2.1. Le niveau ovarien et les stéroïdes sexuels	29
2.2.1.1. Les œstrogènes et les androgènes	29
2.2.1.2. Les progestagènes	35
2.2.2. Le niveau hypophysaire et les gonadotropines.....	38
2.2.2.1. Synthèse	38
2.2.2.2. Modes d'action et rôles.....	38
2.2.2.3. Les gonadotropines au cours du cycle	39
2.2.2.4. La régulation des gonadotropines	40
2.2.3. Le niveau cérébral, les GnRHs et autres facteurs cérébraux	40
2.2.3.1. Les GnRHs.....	40
2.2.3.2. Les autres facteurs cérébraux.....	45

TABLE DES MATIERES

2.2.4.	La dopamine	47
2.2.4.1.	Synthèse et dégradation	47
2.2.4.2.	Rôles	48
2.2.4.3.	Les récepteurs	49
2.2.4.4.	Mécanismes d'actions et voies de signalisation	53
2.2.4.5.	La dopamine au cours du cycle de reproduction	57
2.3.	La régulation des phases finales de la reproduction	57
2.3.1.	La maturation méiotique ovocytaire.....	57
2.3.1.1.	L'acquisition de la compétence folliculaire et ovocytaire	58
2.3.1.2.	Le phénomène de maturation proprement dit.....	58
2.3.2.	L'ovulation	60
3.	Les différents moyens de contrôle de la reproduction.....	61
3.1.	Le contrôle des paramètres environnementaux en conditions captives	62
3.2.	Les différents traitements hormonaux	63
3.2.1.	L'hypophysation et les gonadotropines purifiées de poissons	63
3.2.2.	L'hCG ou <i>human Chorionic Gonadotropin</i>	64
3.2.3.	La GnRH et les analogues de la GnRH GnRH _a	66
3.3.	La dopamine et les antagonistes des récepteurs de la dopamine	69
3.3.1.	La GnRH associée à un antagoniste des récepteurs de la dopamine	69
3.3.2.	Les antagonistes des récepteurs de la dopamine seuls	70
	PROBLEMATIQUES & OBJECTIFS	72
	CHAPITRE I.....	75
	CONTEXTE DU CHAPITRE II	87
	CHAPITRE II	90
	CONTEXTE DU CHAPITRE III	150
	CHAPITRE III.....	152
	DISCUSSION GENERALE.....	192
1.	Rappel des objectifs et plan de la discussion.....	193
2.	Implication des récepteurs de la DA dans la régulation de l'axe gonadotrope	194
2.1.	Quel est le rôle des récepteurs de la famille D ₁ <i>in vivo</i> ?	194
2.2.	A quel niveau de l'axe gonadotrope agirait la SCH23390 <i>in vivo</i> ?	195
2.2.1.	Première hypothèse : le SCH23390 agit au niveau cérébral	195

TABLE DES MATIERES

2.2.2.	Seconde hypothèse : le SCH23390 agit au niveau hypophysaire.....	196
2.2.3.	Troisième hypothèse : le SCH23390 agit au niveau ovarien.....	196
2.3.	Des récepteurs et leur profil d'expression au service de nos trois hypothèses ?	196
2.4.	Une étude <i>in vitro</i> pour comprendre les effets <i>in vivo</i>	199
2.5.	Quelques hypothèses pour comprendre ces contradictions entre nos expériences <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	200
3.	Implication des récepteurs de la DA lors des phases finales de l'ovogenèse.....	203
4.	Les limites de notre étude	205
4.1.	Les facteurs populationnels.....	205
4.2.	Les facteurs méthodologiques.....	207
	CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	210
	LISTE DES TABLEAUX & FIGURES.....	213
	LISTE DES ESPECES	216
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	218
	VALORISATIONS SCIENTIFIQUES	238

**INTRODUCTION
GENERALE**

INTRODUCTION GENERALE

Au cours des 60 dernières années, la consommation mondiale de produits aquatiques n'a cessé de croître (de 9,0 kg/hab/an en 1961 à environ 20,2 kg/hab/an en 2015). En 2016 et 2017, la FAO estime que cette consommation atteint respectivement 20,3 et 20,5 kg/hab/an (FAO, 2018a). Face à l'augmentation constante de la population mondiale (9 milliards de personnes estimées en 2050), les ressources naturelles s'épuisent et l'activité de pêche, stagnante (environ 90 millions de tonnes par an), ne peut plus satisfaire cette consommation croissante. Néanmoins, l'aquaculture, en pleine expansion depuis quelques décennies (de 47,3 millions de tonnes en 2006 à 80 millions de tonnes en 2016 ; Figure 1 ; Tableau 1 ; FAO, 2012, 2018a), est capable de répondre à cette demande croissante des marchés (FAO, 2018a).

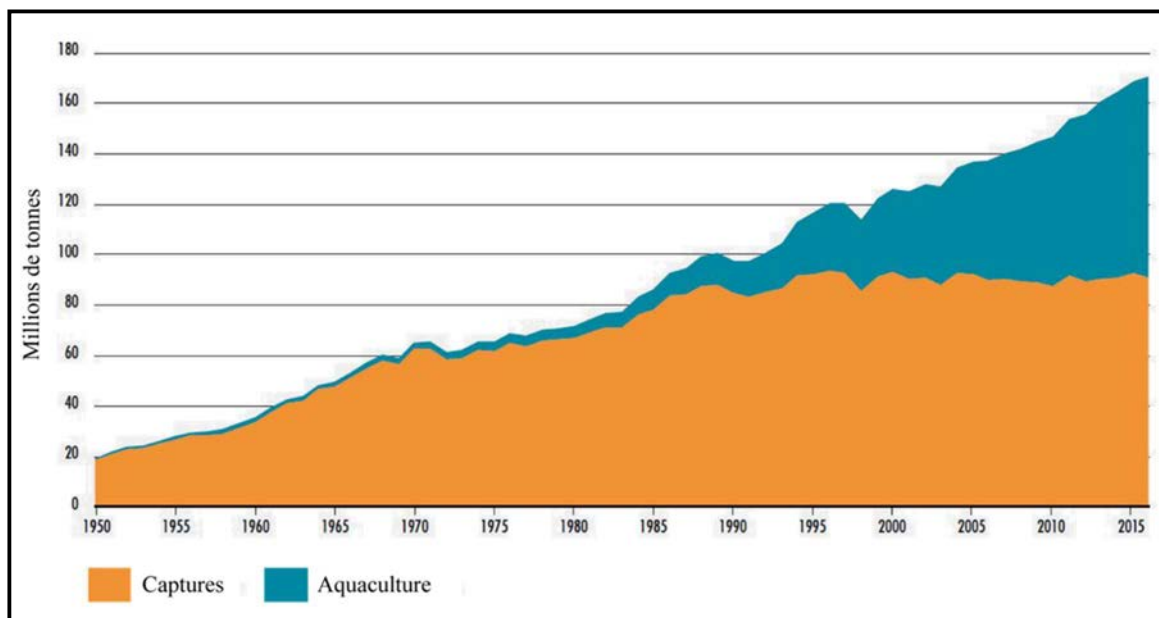


Figure 1 : Production mondiale de l'aquaculture et des pêches (en millions de tonnes ; d'après la FAO, 2018a).

Toutefois, la durabilité de la pisciculture, dont 85% de la production reposent sur seulement 15 espèces allochtones, est largement remise en cause par la société (Lazard et Levêque, 2009). En effet, des études ont montré que l'introduction d'espèces en dehors de leur aire d'origine présente des risques pour l'environnement tels que l'introduction possible de pathogènes, d'espèces invasives ainsi que des modifications de la diversité génétique (Fontaine et al., 2009). Afin de limiter ces risques, une des solutions serait d'encourager une diversification de la production aquacole reposant sur la domestication d'espèces locales autochtones ou naturalisées (Fontaine, 2009; Lazard et Levêque, 2009). Cela permettrait non

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1 : Pêcheries mondiales et production aquacole et utilisation (million de tonnes, d'après la FAO, 2012, 2018a)^a

Catégorie	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Production											
Capture											
Continentale	9,8	10,0	10,2	10,4	11,2	10,7	11,2	11,2	11,3	11,4	11,6
Marine	80,2	80,4	79,5	79,2	77,4	81,5	78,4	79,4	79,9	81,2	79,3
Capture totale	90,0	90,3	89,7	89,6	88,6	92,2	89,5	90,6	91,2	92,7	90,9
Aquaculture											
Continentale	31,3	33,4	36,0	38,1	41,7	38,6	42,0	44,8	46,9	48,6	51,4
Marine	16,0	16,6	16,9	17,6	18,1	23,2	24,4	25,4	26,8	27,5	28,7
Aquaculture totale	47,3	49,9	52,9	55,7	59,9	61,8	66,4	70,2	73,7	76,1	80,0
TOTAL DES PECHERIES MONDIALES	137,3	140,2	142,6	145,3	148,5	154,0	156,0	160,7	164,9	168,7	170,9
Utilisation ^b											
Consommation humaine	114,3	117,3	119,7	123,6	128,3	130,0	136,4	140,1	144,8	148,4	151,2
Utilisations non-alimentaire	23,0	23,0	22,9	21,8	20,2	24,0	19,6	20,6	20,0	20,3	19,7
Population (<i>billions</i>)	6,6	6,7	6,7	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2	7,3	7,3	7,4
Consommation de poisson par habitant (<i>kg</i>)	17,4	17,6	17,8	18,1	18,6	18,5	19,2	19,5	19,9	20,2	20,3

^a Excluant les mammifères aquatiques, les crocodiles, les alligators et les caïmans, les algues et autres plantes aquatiques.

^b Les données d'utilisation entre 2014-2016 ont provisoirement été estimées.

INTRODUCTION GENERALE

non seulement une meilleure adaptation de la pisciculture à la demande des marchés mais également de limiter les impacts sur l'environnement grâce à une meilleure intégration des espèces locales aux territoires (Fontaine et al., 2009).

Depuis plusieurs années, le sandre, *Sander lucioperca*, est devenu une espèce d'intérêt pour la diversification de l'aquaculture européenne. En effet, en plus de son taux de croissance élevée, sa valeur récréative, la qualité de sa chair et sa valeur commerciale en font une espèce prometteuse au niveau économique (Legendre and Albaret, 1991; Kestemont et al., 2015; Źarski et al., 2015a; FAO, 2018b). Malgré une augmentation de la production aquacole ces dernières décennies avec un volume de 900 tonnes en 2014, celle-ci reste encore très faible par

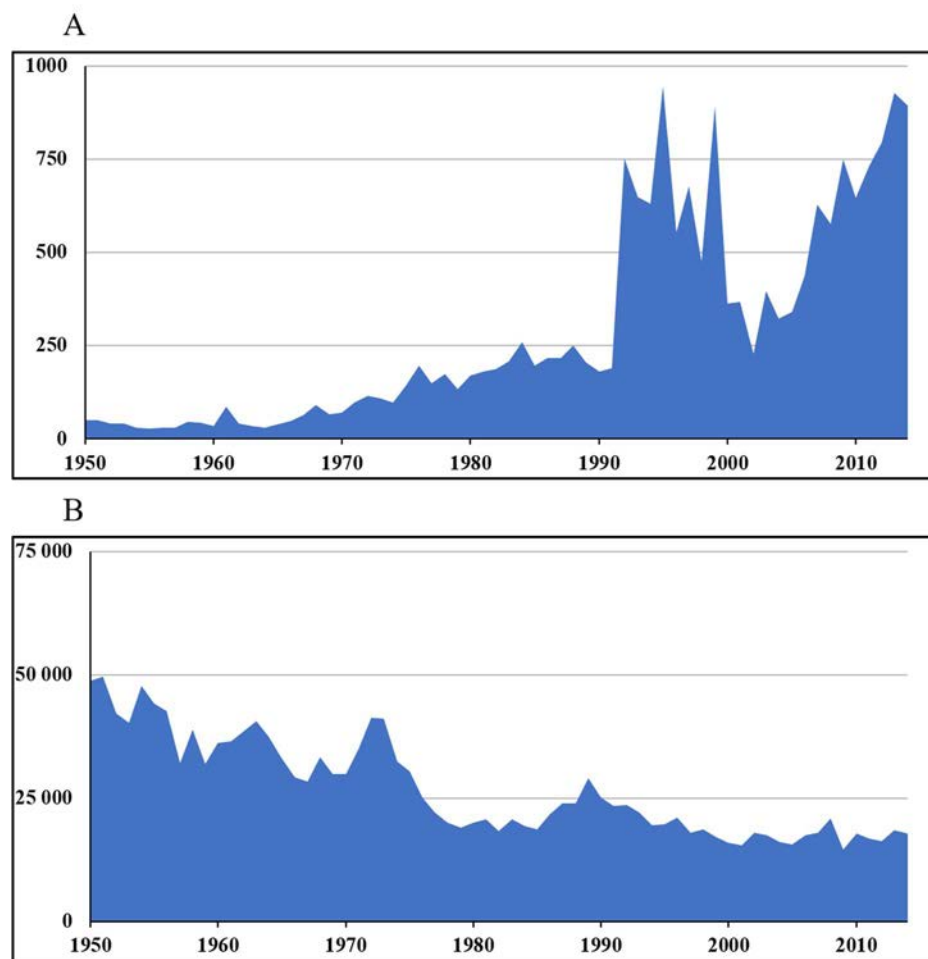


Figure 2 : Production mondiale (en tonnes) du sandre issue de (A) l'aquaculture et de (B) la pêche (source : FAO FISHSTAT dans FAO, 2018b)

INTRODUCTION GENERALE

rapport au tonnage issu de l'activité de pêche, dont les captures, divisées par trois depuis 1950 ont atteint environ 17000 tonnes en 2014 (Figure 2 ; FAO, 2018b).

Actuellement en stagnation, ces captures ne peuvent pas faire face à la demande croissante des marchés rendant pertinent le développement d'une aquaculture durable du sandre (FAO, 2018b). La production aquacole d'une espèce nécessite chaque année un approvisionnement abondant en œufs et en juvéniles viables et ceci de façon synchrone et prévisible. A cette fin, la compréhension et le contrôle du cycle de reproduction de l'espèce est une étape nécessaire (Fostier et Jalabert, 2004; Lubzens et al., 2010; Źarski et al., 2015b).

Dans cet état de l'art, nous rappellerons l'ensemble des mécanismes biologiques qui accompagnent le cycle de reproduction des téléostéens et notamment les phases finales de l'ovogenèse qui sont importantes pour la pérennisation de la production. Par la suite, nous résumerons les principales procédures d'induction de l'ovulation et de la ponte, notamment par l'utilisation de traitements hormonaux chez les téléostéens d'intérêt aquacoles. Nous ciblerons en particulier l'action des antagonistes des récepteurs de la dopamine (DA), molécules qui semblent prometteuses au regard de l'efficacité démontrée chez un nombre important d'espèces. Mais tout d'abord, nous ferons une brève présentation du sandre et de sa reproduction afin de mieux comprendre son mode de vie et ses besoins.

Ainsi, cette synthèse s'articule autour de trois parties principales :

1. Le modèle biologique, le sandre, *Sander lucioperca*
2. La reproduction chez les femelles de téléostéens
3. Les différents moyens de contrôle de la reproduction

ETAT DE L'ART

ETAT DE L'ART

1. Le modèle biologique : le sandre, *Sander lucioperca*

1.1. Présentation générale de l'espèce

Le sandre, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) est un poisson téléostéen qui fait partie de l'ordre des perciformes et plus exactement de la famille des Percidés, Percidae. Originaire d'Europe centrale et orientale avec la mer Baltique au Nord et l'Elbe à l'ouest, jusqu'au sud-ouest de la Russie, le sandre s'est fortement étendu vers le Nord et l'Ouest de l'Europe et dans les pays du Maghreb. Ainsi, son aire de répartition (Figure 3) s'étend des pays scandinaves (au Nord) aux pays du Maghreb (au Sud), de l'Espagne (à l'Ouest) vers la mer d'Aral (à l'Est). Actuellement, nous pouvons le retrouver dans l'ensemble du réseau hydrographique français tel que dans la Seine, la Loire, le Rhône, en Camargue, dans l'Hérault jusqu'à la Garonne (Bruslé et Quignard, 2001; Lappalainen et al., 2003; Poulet, 2004).

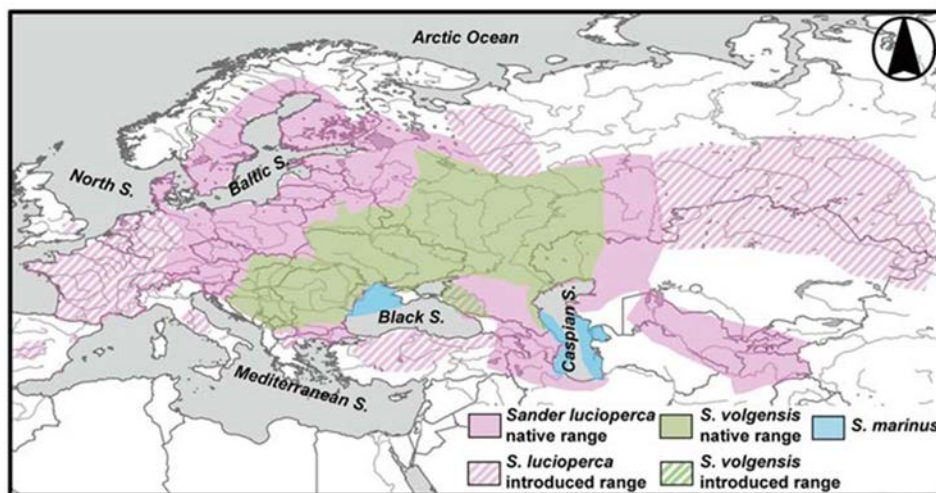


Figure 3 : Aire de répartition du Sandre dans le monde (d'après Stepien et Haponki, 2015).

Le sandre est une espèce crépusculaire qui vit dans les eaux calmes et profondes des rivières, lacs, étangs et canaux à l'abri de la lumière (espèce lucifuge). Il préfère des eaux mésotrophes, troubles, saumâtres, de moyenne ou grande superficie avec des teneurs en oxygène qui sont supérieures à 3.5 mg/L (Lind, 1977; Lappalainen et al., 2003; Bruslé et Quignard, 2001; Kottelat et Freyhof, 2007).

De grande taille à l'âge adulte, de 40 cm jusqu'à parfois 1,30 m pour des poids allant jusqu'à 10-15 kg, le sandre, ichtyophage, est un carnassier qui se nourrit essentiellement de petits poissons (ablettes, brèmes, goujons, petits gardons, rotengles et barbeaux ...).

Bien que le sandre soit sédentaire, il peut toutefois parcourir de longues distances (des dizaines de km) à la recherche de meilleures conditions de vie ou de frayères appropriées pour

ETAT DE L'ART

sa reproduction (Lappalainen et al., 2003). Enfin, du point de vue anatomique, aucun trait phénotypique extérieur ne permet de distinguer le mâle de la femelle excepté au moment de la reproduction où le mâle présenterait un ventre plus gris que blanchâtre (Bruslé et Quignard, 2001).

1.2. La reproduction, le développement et l'environnement du sandre en conditions naturelles

Chez les téléostéens des milieux tempérés, la reproduction peut-être dépendante de la photopériode mais également de la température (Wang et al., 2010; Figure 4). Pour le sandre qui est un pondeur annuel synchrone, les ovocytes ont une croissance simultanée et la ponte intervient une fois dans l'année à une température comprise entre 8 et 16°C selon la localisation géographique (Lappalainen et al., 2003; Kottelat et Freyhof, 2007). En France, elle a lieu entre mars et début juin quand la température de l'eau est entre 12 et 15°C (Figure 4; Poulet, 2004). Au sein d'une même population de sandre, la durée de la période de reproduction dépend de la température de l'eau mais également de la différence d'âge entre les individus. Ainsi, plus

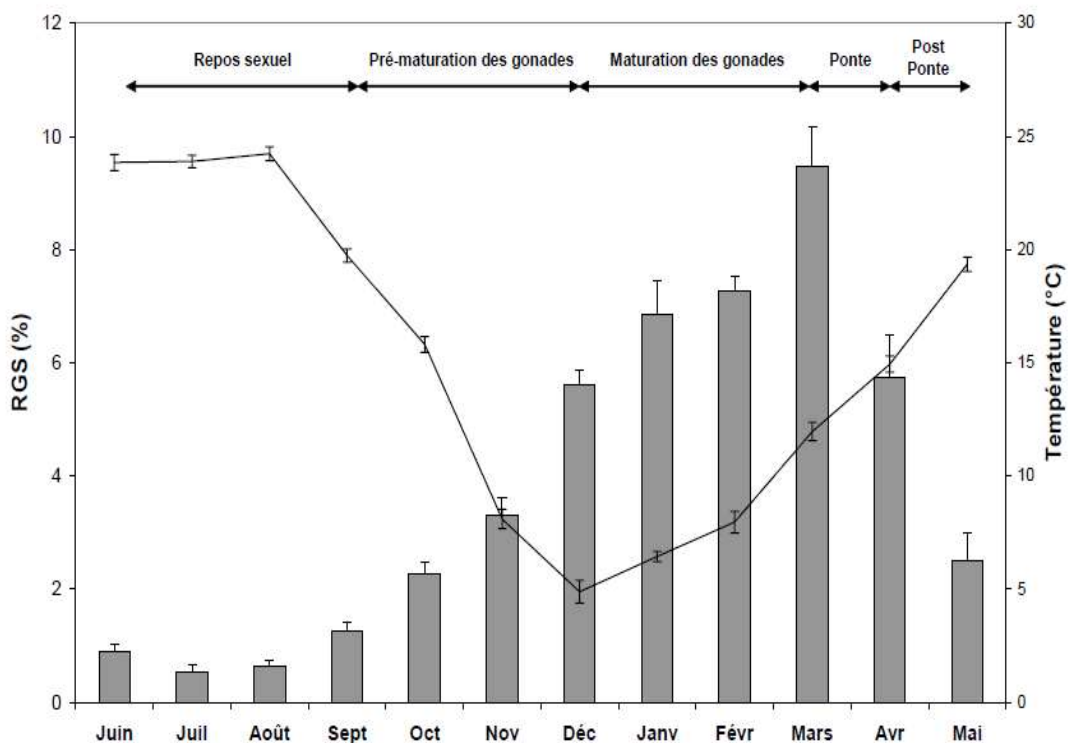


Figure 4 : Variations annuelles du Rapport Gonado-Somatique (RGS ; %) chez les femelles de sandres, et de la température de l'eau (°C) observées en Camargue. Les différentes étapes du cycle sexuel sont indiquées (d'après Poulet, 2004).

ETAT DE L'ART

l'hétérogénéité d'âge est forte, plus la période de reproduction est longue (Lappalainen et al., 2003).

Au moment de la reproduction, le mâle construit un nid rudimentaire au niveau de zones de frayères (Lappalainen et al., 2003) se situant à plus de 0.5 mètre de profondeur, sur un sol dur, sableux, racineux ou graveleux. La femelle, très prolifique, pond plus de 100 000 ovocytes par kg qu'elle déposera sur des supports variés (Schlumberger et Proteau, 1996; Bruslé et Quignard, 2001; Kucharczyk et al., 2007). Les ovocytes pondus sont bruns, transparents, disposés en grappes et collent au substrat (Schlumberger et Proteau, 1996; Bruslé et Quignard 2001). Suite à la ponte, les femelles de sandre s'en vont du nid et entrent en phase de repos sexuel (juin-septembre) qui prend fin à l'initiation de leur prochain cycle de reproduction lorsque la température et la photopériode sont décroissantes (Poulet, 2004; Kottelat et Freyhof, 2007; Wang et al., 2010).

De son côté, le mâle, après avoir fécondé les œufs, est très agressif et s'occupe d'éloigner les prédateurs et de nettoyer le nid jusqu'à l'éclosion (Schlumberger et Proteau, 1996; Lappalainen et al., 2003; Kottelat et Freyhof, 2007). L'incubation peut durer jusqu'à 110-120 degrés*jours (à 12-13°C) avec des températures optimales variables selon les études (Schlumberger et Proteau, 1996; Bruslé et Quignard, 2001; Lappalainen et al., 2003).

Après éclosion, les larves (3 à 7 mm selon les études) passent par différents régimes alimentaires en fonction de différents paramètres dont l'augmentation de leur taille corporelle. Ils passent successivement d'un régime planctonophage (zooplancton), benthophage (larves de chironomes), entomophage (insectes) pour enfin devenir ichtyophage (poissons) à une taille de 3-4 cm. A 15-18 cm de longueur (fin du premier été), les sandres sont exclusivement ichtyophages. La gamme de température optimale pour la croissance est de 28 à 30°C (Bruslé et Quignard, 2001). Ainsi, les paramètres environnementaux sont des éléments essentiels dans le cycle de vie du sandre, notamment pour la réussite de sa reproduction. En effet, la chute brutale de la température peut interrompre la reproduction et des températures supérieures à 20°C peut diminuer le nombre de larves qui éclosent normalement (Lappalainen et al., 2003). Ce succès dépend aussi d'un enchaînement précis de mécanismes biologiques qui conduisent le géniteur à un état de maturité sexuelle propice à l'émission des gamètes.

2. La reproduction chez les femelles de poissons téléostéens

Chez les téléostéens, les espèces peuvent présenter des stratégies de reproduction très différentes. Par exemple, certaines espèces sont vivipares alors que d'autres sont ovipares. De plus, certaines sont hermaphrodites (environ 10% des espèces) tandis que 90% sont gonochoriques. Malgré cette diversité, des études ont montré que la majorité des espèces présente des caractéristiques communes dans le cycle de différenciation et de maturation des cellules germinales (Lubzens et al., 2010). Le sandre est une espèce ovipare et gonochorique.

2.1. Le cycle de reproduction

Chez les femelles de téléostéens et notamment chez les espèces des eaux tempérées comme les percidés, le cycle de reproduction est composé de trois phases principales: l'initiation de l'ovogenèse, la croissance ovocytaire (ou vitellogenèse) et enfin, les phases finales de l'ovogenèse constituées de la maturation méiotique ovocytaire et de l'ovulation (Wang et al., 2010).

2.1.1. Les phases d'initiation et de vitellogenèse

2.1.1.1. La phase d'initiation

Au cours de cette phase, les ovogonies prolifèrent par mitoses et se différencient en ovocytes primaires qui sont des ovogonies entrées en 1^{ère} division de méiose et bloquées en prophase I (Nagahama, 1983). A la fin de cette phase, les ovogonies (ou ovocytes primaires) sont entouré(e)s de cellules somatiques correspondant aux cellules folliculaires, les cellules de la granulosa (cubiques) séparées des cellules de la thèque (associées à des vaisseaux sanguins) par la lame basale (Selman et al., 1993; Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2010). Cette dernière est sécrétée par les cellules de la granulosa et permet d'isoler l'ovocyte du stroma ovarien (Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2010). Toutes les cellules folliculaires sont reliées entre elles par des jonctions GAP (cellules de la granulosa) ou adhérentes (cellules de la thèque). De plus, au niveau de la membrane de l'ovocyte s'échappent des microvillosités qui permettront les futurs échanges entre l'ovocyte et la circulation sanguine par l'intermédiaire des cellules folliculaires (Le Menn et al., 2007). Chez le sandre, cette phase a lieu d'août à septembre (Poulet, 2004).

ETAT DE L'ART

2.1.1.2. Stade alvéole corticale et vitellogénèse

2.1.1.2.1. Stade alvéole corticale

Suite à la phase d'initiation, l'ovocyte primaire subit une phase de croissance importante, c'est le stade alvéole corticale. Chez le sandre, cette étape se déroule de septembre à décembre (Poulet, 2004). Durant cette période, l'ovocyte primaire grossit et incorpore un grand nombre de molécules et d'énergie qui lui permettront d'assurer le futur développement embryonnaire (Le Menn et al., 2007). En effet, en plus d'ARN, d'importantes quantités de lipides s'accumulent dans le cytoplasme ovocytaire sous forme de gouttelettes lipidiques. En plus faible quantité, il y a également une accumulation de glycoprotéines incorporées dans des alvéoles corticales nouvellement formées (Patino et Sullivan, 2002). Ces alvéoles seraient impliquées dans la réaction corticale du gamète femelle au moment de la fécondation. En fusionnant avec la membrane ovocytaire, ces organites libéreraient leur contenu dans l'espace périvitellin et empêcheraient une fécondation multiple (Wallace et Selman, 1981; Le Menn et al., 2007). En parallèle, deux couches externes de la zone pellucide se forment entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte (Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2010).

2.1.1.2.2. Phase de vitellogénèse

L'ovocyte subit ensuite la phase de vitellogénèse qui a lieu de décembre à mars chez le sandre (Poulet, 2004). Durant cette étape, il y a une incorporation importante de globules vitellins (protéines vitellines issues du clivage de la Vitellogénine du foie) provoquant la croissance rapide de l'ovocyte primaire (Wallace et Selman, 1990; Le Menn et al., 2007). C'est à ce moment du cycle que les différentes enveloppes de l'ovocyte achèvent leur différenciation, notamment par la formation de la zone pellucide interne entre la zone pellucide externe et l'ovocyte (Patino et Sullivan, 2002; Le Menn et al., 2007; Lubzens et al., 2010). Enfin, c'est lors de cette étape que le(s) micropyle(s), lieu de pénétration du spermatozoïde, est (sont) complètement formé(s) (Lukšienė et Svedang, 1997; Le Menn et al., 2007). Chez le sandre, un seul micropyle est présent.

2.1.2. Les phases finales de l'ovogénèse

Comme rapporté par Yaron et Levavi-Sivan (2011), l'ovocyte post-vitellogénique peut rester quiescent pendant quelques mois avant d'entrer dans le processus de maturation méiotique ovocytaire. La réception du signal adéquat (environnemental, social ou hormonal)

ETAT DE L'ART

par l'ovocyte le fera rentrer dans cette étape de maturation qui se terminera par l'ovulation et l'oviposition (Wallace et Selman, 1981; Wang et al., 2010; Yaron et Levavi-Sivan, 2011).

2.1.2.1. La maturation méiotique ovocytaire

Au cours de la maturation méiotique ovocytaire se mettent en place des changements (nucléaires et cytoplasmiques) qui sont nécessaires pour la fécondation et le développement embryonnaire (Patino et Sullivan, 2002). Cette étape se caractérise notamment par la reprise de la méiose. L'ovocyte primaire qui était arrêté en prophase I depuis la phase d'initiation, achève sa première division méiotique et émet son premier globule polaire. Il se retrouve ensuite bloqué en deuxième division de méiose (métaphase II) jusqu'à la fécondation (Patino et Sullivan, 2002).

Pendant ce temps, des changements morphologiques ont également lieu dans l'ovocyte. La vésicule germinative migre vers la périphérie ovocytaire jusqu'au micropyle où il y a rupture de son enveloppe (Nagahama, 1983). Cette étape est nommée stade GVBD pour *Germinal Vesicle BreakDown* (Nagahama, 1983; Yaron et Levavi-Sivan, 2011). De plus, au niveau cytoplasmique, il y a non seulement une coalescence des gouttelettes lipidiques en une seule goutte unique mais également un éclaircissement et une réorganisation profonde du vitellus de

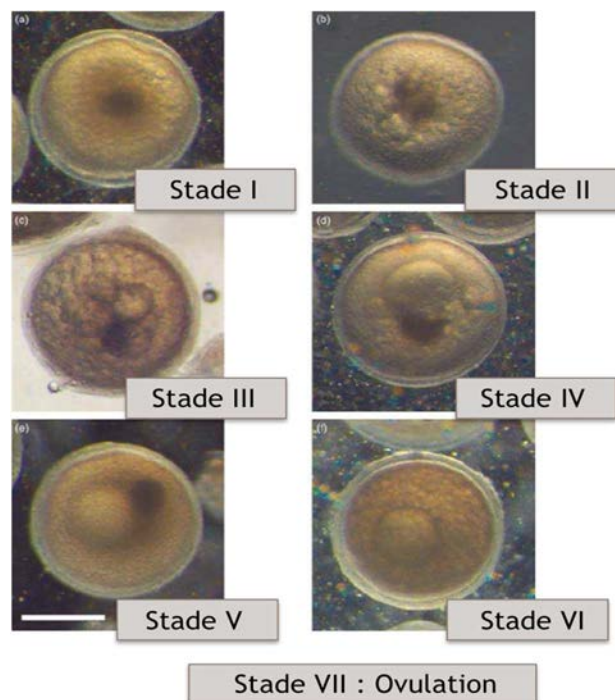


Figure 5 : Les stades de maturation observés lors des phases finales de l'ovogénèse chez le sandre : I à VI illustrent l'avancée de la maturation méiotique ovocytaire et VII l'ovulation (modifié d'après Zarski et al., 2012a).

ETAT DE L'ART

l'ovocyte sous l'action d'enzymes protéolytiques comme les Cathepsines (Carnevali et al., 1999; Milla et al., 2006; Le Menn et al., 2007; Źarski et al., 2015b). Enfin, chez certaines espèces de téléostéens notamment les espèces marines, est observée une augmentation, plus ou moins importante, du volume ovocytaire, par entrée d'eau dans l'ovocyte (Wallace et Selman, 1978; Carnevali et al., 1999; Milla et al., 2006; Le Menn et al., 2007). D'après plusieurs études, ces événements cytoplasmiques seraient liés. Suite au clivage enzymatique du vitellus, des acides aminés sont libérés ce qui s'accompagne d'une entrée d'ions dans l'ovocyte créant un déséquilibre osmotique. Ce gradient osmotique déclenche une entrée d'eau et l'augmentation du volume ovocytaire chez certaines espèces (Greeley et al., 1991; Finn et al., 2002; Milla et al., 2006; Le Menn et al., 2007; Mañanós et al., 2008) même si ce phénomène reste à démontrer chez le sandre.

En fonction de ces événements cellulaires, l'avancée de la maturation méiotique ovocytaire est découpée selon différents stades. Aujourd'hui, plusieurs systèmes de classification existent chez différentes espèces de poissons dont le sandre (Kucharczyk et al., 2007; Zakes et Demska-Zakes, 2009; Źarski et al., 2012a). Chez le sandre, certains séparent la maturation méiotique ovocytaire selon quatre stades en se basant sur la migration de la vésicule germinative et prenant, ou non, en compte la morphologie de la gouttelette lipidique (Kucharczyk et al., 2007; Zakes et Demska-Zakes, 2009). Considérant ces méthodes comme trop imprécises pour décrire les changements observés au cours de la maturation méiotique ovocytaire, Źarski et ses collaborateurs ont appliqué une nouvelle méthode de classification qui permet non seulement d'améliorer la gestion de la reproduction du sandre en conditions contrôlées mais également sa synchronisation (Źarski et al., 2012a).

Cette classification est composée de sept stades, numérotés de I à VII suivant la progression du processus de maturation (Figure 5). La classification de I à VI fait apparaître progressivement une modification du cytoplasme avec l'observation de plusieurs gouttelettes peu visibles qui fusionnent en une seule goutte bien visible, ainsi que la migration de la vésicule germinative du centre vers la périphérie de l'ovocyte. Après avoir atteint le stade GVBD (stade VI), l'ovulation a lieu (stade VII).

2.1.2.2. L'ovulation

L'ovulation consiste en la libération de l'ovocyte secondaire mature dans la cavité ovarienne ou abdominale (chez les salmonidés) après son expulsion du follicule ovarien

ETAT DE L'ART

(Goetz, 1983; Goetz et Garczynski, 1997; Żarski et al., 2015b). Cette ovulation serait comparable à une réaction inflammatoire où les prostaglandines et les enzymes protéolytiques auraient leur rôle (Espey, 1980). L'implication de catécholamines et de peptides vasoactifs a également été suggérée (Goetz et Garczynski, 1997).

2.2. Le contrôle neuroendocrinien de la reproduction

En lien avec le pilotage environnemental (température, photopériode, salinité...) du cycle (Wang et al., 2010), les téléostéens sont soumis à un contrôle neuroendocrinien au travers de l'axe gonadotrope. Cet axe est composé de trois éléments principaux, le cerveau, l'hypophyse et les gonades.

2.2.1. Le niveau ovarien et les stéroïdes sexuels

Tout au long du cycle, les ovaires produisent et sécrètent des stéroïdes sexuels qui vont réguler la gamétogenèse, la différenciation des caractères sexuels secondaires et le comportement reproducteur (Legendre et Jalabert, 1983). Chez les femelles de téléostéens, les stéroïdes sexuels majoritairement produits au cours du cycle sont les œstrogènes notamment la 17β œstradiol (E_2), les androgènes notamment la testostérone (T) et la 11 kétotestostérone (11KT) (Borg, 1994) ainsi que des progestagènes notamment la 17α , 20β dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17, 20\beta$ P ou DHP) et la 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20β -S).

2.2.1.1. Les œstrogènes et les androgènes

2.2.1.1.1. Synthèse et rôles

Synthèse

La synthèse des stéroïdes sexuels s'effectue au sein des cellules folliculaires à partir du cholestérol (Lubzens et al., 2010; Miller et Auchus, 2011; Miller, 2013). Initialement, celui-ci doit être transféré au sein de la mitochondrie par l'action d'une enzyme de transfert, la StAR ou *Steroidogenic Acute Regulatory protein* (Miller et Auchus, 2011; Miller, 2013). En fonction de la période du cycle, l'action de différentes enzymes s'enchaîne ensuite afin de produire les différents stéroïdes sexuels (Figure 6).

Un modèle de coopération cellulaire entre les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque a été proposé chez les salmonidés (Kagawa et al., 1982). Toutefois, l'existence de ce modèle a

ETAT DE L'ART

été remise en cause par des travaux menés chez le choquemort, *Fundulus heteroclitus*, chez qui chaque cellule folliculaire possède toutes les enzymes nécessaires à la production d'E₂ (Petrino et al., 1989). Dans ce modèle salmonidé, après la stimulation hypophysaire par la FSH ou *Follicle Stimulating Hormone* (cf. partie 2.2.2.), la T est produite dans les cellules de la thèque à l'aide de plusieurs enzymes, la StAR, la P450scc ou *P450 side-chain cleavage*, la P450c17 ou *cytochrome P450 17-hydroxylase*, la 3β-HSD ou *3β-hydroxysteroid deshydrogenase* et la 17β-HSD et selon différentes voies de signalisation possibles (Figure 6). Elle est ensuite transportée dans les cellules de la granulosa où elle est transformée en E₂ (Kagawa et al., 1982) par l'action de la P450 aromatase (P450arom). Une étude chez la truite de mer, *Salmo trutta*,

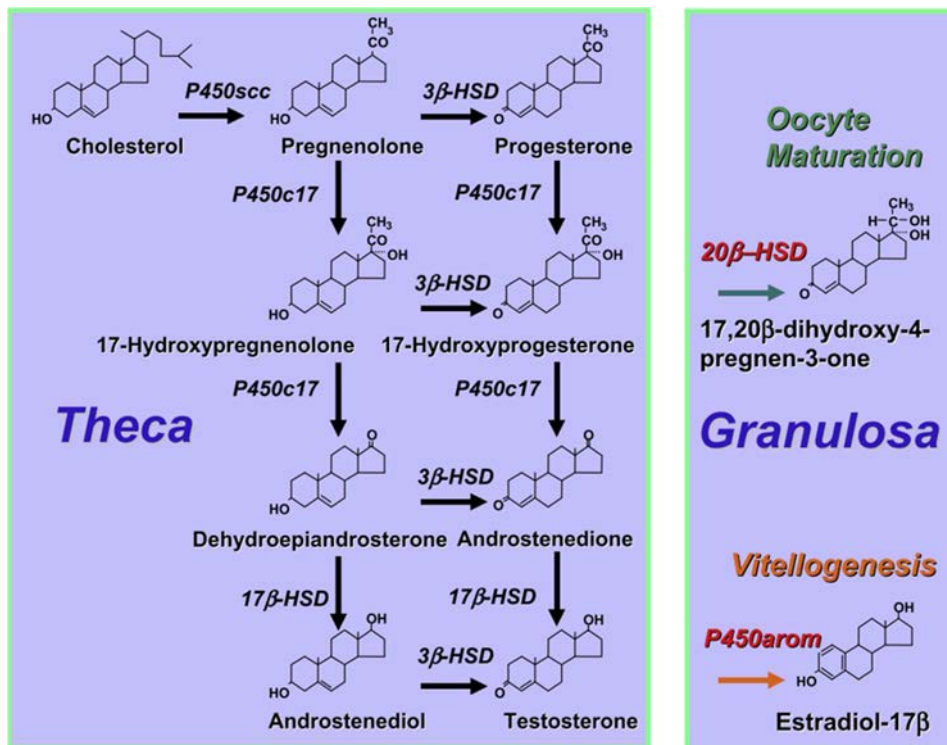


Figure 6 : Les différentes voies de biosynthèse des stéroïdes sexuels dans les gonades des téléostéens. P450scc, *P450 side-chain cleavage* ; 3β-HSD, *3β-hydroxysteroid deshydrogenase* ; P450c17, *cytochrome P450 17-hydroxylase* ; 17β-HSD, *17β-hydroxysteroid deshydrogenase* ; 20β-HSD, *20β-hydroxysteroid deshydrogenase* ; P450arom, *P450 aromatase* (Lubzens et al., 2010).

montre que la FSH serait indirectement responsable de la production d'E₂ car elle stimulerait l'expression et l'activité de la P450 aromatase (Montserrat et al., 2004). Toutefois, cette observation est contredite par une étude conduite chez la dorade japonaise, *Pagrus major*, chez qui seuls la LH pour *Luteinizing Hormone*, et l'IGF-1 pour *Insulin-Growth Factor I* peuvent stimuler l'expression des gènes de l'aromatase (Kagawa et al., 2003).

ETAT DE L'ART

Rôles

- de l'E₂

Une fois synthétisée, l'E₂ va exercer ses différentes fonctions et notamment la régulation de la production de Vitellogénine au niveau du foie (Ng et Idler, 1983; Nagahama, 1994; Devlin et Nagahama, 2002; Lubzens et al., 2010). D'autres rôles sont également exercés par l'E₂ tels que la stimulation de la synthèse hépatique de protéines membranaires de l'ovocyte telles que la Choriogénine ainsi que la régulation du métabolisme des glucides et lipides (Rinchard et al., 1998; Devlin et Nagahama, 2002). Enfin, l'E₂ régulerait également la maturation méiotique ovocytaire (Pang et al., 2008). En effet, ces derniers ont montré chez le tambour brésilien, *Micropogonias undulatus*, qu'au cours de la vitellogenèse, l'E₂ bloque le déclenchement de la maturation méiotique ovocytaire via le RCPG ou *G Protein-Coupled Receptor*, GPR30. Cette équipe émet l'hypothèse que cette inhibition permettrait de synchroniser la maturation méiotique ovocytaire en la retardant jusqu'à ce que le stéroïde responsable de la maturation soit produit en quantité suffisante pour surmonter l'action inhibitrice de l'E₂ (Pang et al., 2008).

- de la 11KT

Suite à l'action de deux enzymes, la P45011 β ou *P450 11 β -hydroxylase* et la 11 β -HSD ou *11 β -hydroxysteroid deshydrogenase*, la T va également être le précurseur de la 11KT. Cette hormone est souvent considérée comme ayant des taux supérieurs chez le mâle par rapport à la femelle. Toutefois, cette hormone a été retrouvée chez les femelles de salmonidés et parfois à des taux supérieurs à ceux relevés chez les mâles d'autres espèces (Borg, 1994). Le rôle de ce stéroïde chez les femelles reste très méconnu. Des auteurs suggèrent que chez l'anguille d'Australie, *Anguilla australis*, la 11KT serait impliquée dans la croissance ovocytaire prévitellogénique (Rohr et al., 2001; Lokman et al., 2007). D'autres montrent que la 11KT augmenterait la production de Vitellogénine induite par l'E₂ chez l'Anguille du Japon, *Anguilla japonica* (Asanuma et al., 2003).

- de la T

En plus d'être le précurseur de la production d'E₂ et de 11KT, les rôles de la T sont beaucoup moins clairs. Kime (1993) suggère qu'à la fin de la vitellogenèse, elle serait responsable du maintien des ovocytes dans des conditions viables jusqu'à ce que la maturation

ETAT DE L'ART

méiotique ovocytaire soit initiée (Kime, 1993). D'autres proposent que la T soit impliquée dans la synchronisation de la maturation finale et de l'ovulation. Par exemple, chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, la T stimulerait l'action de la LH sur la production de l'hormone inductrice de la maturation méiotique ovocytaire au niveau des cellules folliculaires (Jalabert et Fostier, 1984). La T serait également impliquée dans le contrôle du comportement reproducteur ou encore dans la régulation de la production de GnRH ou *Gonadotropin Releasing Hormone*, et des gonadotropines (Fostier et al., 1983; Pankhurst, 2008). Enfin, bien que les mécanismes soient méconnus et les données contradictoires selon les études, il semblerait que la T puisse également avoir un rôle dans la production de Vitellogénine au niveau hépatique (Peyon et al., 1997; Mori et al., 1998; Kim et al., 2003; Ramezani-Fard et al., 2013).

2.2.1.1.2. Les rétrocontrôles des oestrogènes et androgènes

Les stéroïdes sexuels sont également responsables de rétrocontrôles positifs et négatifs au niveau de l'axe cerveau-hypophyse (Yaron et al., 2003; Zohar et al., 2010). Les rétrocontrôles positifs s'effectuent principalement au niveau hypophysaire pour potentialiser la libération de LH suite à la stimulation par la GnRH (Trudeau, 1997). Par exemple, au travers de ce rétrocontrôle positif, la T pourrait déclencher le pic ovulatoire de LH en agissant directement au niveau de l'hypophyse (Crim et Evans, 1979; Kobayashi et al., 1989). Ces rétrocontrôles positifs peuvent également s'effectuer au niveau cérébral et notamment au niveau de l'aire pré-optique (Peng et al., 1994). Les rétrocontrôles négatifs s'effectuent aux différents niveaux de l'axe gonadotrope et notamment au niveau cérébral (Montero et al., 1995; Trudeau, 1997; Van der Kraak et al., 1998; Schmitz et al., 2005).

Les mécanismes de ces rétrocontrôles sont très complexes. En effet, pour les exercer, les stéroïdes sexuels peuvent réguler l'activité de certains neuropeptides et neurotransmetteurs (GnRH, neuropeptide Y (NPY), dopamine (DA), GABA ou *γ-aminobutyric acid*, KISS1...). Par exemple, Peng et al. (1994) ont montré que la T et l'E₂ stimulent l'expression du gène du NPY, régulateur positif de la libération de la LH, dans l'aire pré-optique. Dans le cas de rétrocontrôle négatif, l'E₂ peut agir au travers du système dopaminergique qui régule négativement le système à GnRH inhibant ainsi la LH hypophysaire. Les androgènes peuvent être directement aromatisés en E₂ au niveau cérébral et ainsi exercer leurs actions au travers des récepteurs aux oestrogènes (Linard et al., 1996; Trudeau, 1997; Levavi-Sivan et al., 2010;

ETAT DE L'ART

Zohar et al., 2010). Ce dialogue aux différents niveaux de l'axe permet aux différents composants d'exercer une réponse synchronisée et coordonnée tout au long du cycle de reproduction (Zohar et al., 2010).

2.2.1.1.3. Les concentrations plasmatiques

D'après Kime (1993), les niveaux circulants de stéroïdes sont généralement beaucoup plus importants chez les salmonidés que chez les cypriniformes/siluriformes ou encore chez les perciformes. En effet, des concentrations plasmatiques de l'ordre de 100, 10 voire 1 ng/ml ont été mesurées de façon respective chez ces différent(e)s familles/ordres de téléostéens.

De façon générale, les niveaux plasmatiques de stéroïdes sexuels sont faibles avant la vitellogenèse (Rinchar et al., 1998). Par la suite les niveaux observés dépendent des espèces et de leur stratégie reproductive.

Les concentrations plasmatiques d'E₂

Au cours de la vitellogenèse, les niveaux circulants d'E₂ augmentent plus ou moins rapidement selon les espèces de poissons (Rinchar et al., 1998). Par exemple, chez les salmonidés tels que la truite arc-en-ciel ou le saumon de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, les concentrations d'E₂ augmentent graduellement jusqu'à atteindre un pic de 20 à 50 ng/mL en fin de vitellogenèse pour ensuite chuter rapidement (12 jours avant l'ovulation pour la truite arc-en-ciel) et atteindre 2 ng/mL juste avant l'ovulation (Scott et al., 1983; Fostier et Jalabert, 1986; Goetz et al., 1987). Chez les percidés à l'exception du sandre, les niveaux, beaucoup plus faibles que chez les salmonidés, augmentent rapidement avec des niveaux passant de moins de 0.1 ng/mL pendant la phase de repos sexuel à 3-4 ng/mL en période de croissance ovocytaire importante (Malison et al., 1994; Ciereszko et al., 1997; Sulisty et al., 1998). Selon les percidés, ces niveaux d'E₂ vont ensuite varier différemment. Chez la perche européenne, *Perca fluviatilis*, les concentrations d'E₂ restent stable jusqu'au début de la maturation ovocytaire alors qu'elles diminuent de façon progressive (6 mois avant l'ovulation) chez le sandre américain, *Sander vitreus* et la perchaude, *Perca flavescens* (Malison et al., 1994; Ciereszko et al., 1997; Sulisty et al., 1998). Tandis que les niveaux d'E₂ restent bas chez le sandre américain et la perchaude (≤ 1 ng/mL), un pic d'E₂ est observée chez la perche européenne (environ 4-5 ng/mL) pendant la période pré-ovulatoire (Sulisty et al., 1998; Migaud et al., 2003a). Ce pic

ETAT DE L'ART

en période pré-ovulatoire a également été observé chez le bar blanc d'Amérique, *Morone americana* (Jackson et Sullivan, 1995). Les auteurs suggèrent que ce pic serait le résultat d'un rétrocontrôle positif sur la synthèse ou la libération des gonadotropines impliquées dans la maturation (Jackson et Sullivan, 1995). Chez le sandre, les concentrations plasmatiques sont plus élevées que chez les autres percidés avec des valeurs allant de 1,4 ng/mL (en phase de repos sexuel) jusqu'à 40 ng/mL (pendant la vitellogenèse, soit 5 mois avant l'ovulation ; Ben Ammar et al., 2015). Une autre équipe a mesuré une concentration moyenne entre 50 et 60 ng/mL en période pré-ovulatoire (Sarameh et al., 2012).

Les concentrations plasmatiques de T

Chez la plupart des femelles de téléostéens, la T étant le précurseur de l'E₂, ses niveaux plasmatiques vont augmenter en parallèle de ceux de l'E₂. Avant l'ovulation, l'activité aromatasase est réduite et les niveaux de T vont augmenter à l'inverse de l'E₂ dont les niveaux diminuent. Un pic de T va alors être observé juste avant l'ovulation (Kagawa et al., 1983; Prat et al., 1990; Rinchard et al., 1993; Malison et al., 1994; Noaksson et al., 2004). Toutefois, chez la perche européenne, les niveaux plasmatiques de T demeurent très faibles (< 1 ng/mL) jusqu'en novembre puis augmentent rapidement jusqu'à 15-20 ng/mL et sont maintenus élevés jusqu'à la période d'ovulation (Sulistyo et al., 1998). D'un autre côté, quelques espèces affichent un profil d'expression bimodal, c'est-à-dire qu'ils sécrètent deux pics de T au cours de leur cycle (Prat et al., 1990; Malison et al., 1994). C'est le cas du sandre américain chez lequel on observe un premier pic en novembre (1,6 ng/mL) et un deuxième en avril, juste avant l'ovulation (3,3 ng/mL). Le premier pic de T correspondrait à la reprise de la vitellogenèse avec une production d'E₂ importante (Malison et al., 1994). Le pic pré-ovulatoire serait commun à tous les téléostéens (Migaud, 2002) mais son rôle reste peu clair. Il pourrait être le reflet d'un rétrocontrôle positif au niveau de l'axe cerveau-hypophyse comme nous l'avons développé précédemment. Chez le sandre, des niveaux constants de T (3-4 ng/mL) ont été observés entre la période de repos sexuel et la vitellogenèse (Ben Ammar et al., 2015). Des concentrations du même ordre de grandeur ont été observées lors des phases finales (Sarameh et al., 2012).

ETAT DE L'ART

2.2.1.2. Les progestagènes

Chez les téléostéens, les phases finales de la gamétogenèse sont sous le contrôle d'une hormone stéroïde inductrice de la maturation, *Maturation-Induced-Steroid* or MIS (Nagahama et Yamashita, 2008). Chez un grand nombre d'espèces de téléostéens, la DHP essentiellement mais également la 20 β -S apparaissent comme des inducteurs majeurs de la maturation ovocytaire finale (Nagahama, 1983; Patino et Sullivan, 2002; Nagahama et Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2010). Chez certaines espèces de perciformes comme le bar d'Amérique, *Morone saxatilis* (King et al., 1994b) et le bar européen, *Dicentrarchus labrax* (Asturiano et al., 2000), les deux molécules semblent impliquées dans la régulation de la maturation méiotique ovocytaire. Chez les percidés, la DHP serait le MIS impliquée dans les phases finales de la gamétogenèse (Goetz et Theofan, 1979; Barry et al., 1995; Migaud et al., 2003a).

2.2.1.2.1. Synthèse, modes d'action et rôles

Synthèse

Comme l'E₂, la T et la 11KT, la synthèse des progestagènes met en jeu un certain nombre d'enzymes de la voie de biosynthèse des stéroïdes. Chez les salmonidés, après la stimulation hypophysaire par la LH, les cellules de la granulosa produiront la 17 α -hydroxyprogesterone qui sera ensuite convertie en DHP par la 20 β -HSD ou 20 β -hydroxysteroid deshydrogenase (Patino et Sullivan, 2002; Nagahama et Yamashita, 2008).

Modes d'action et rôles

Les progestagènes vont se fixer sur leurs récepteurs (mPRs) présents au sein de la membrane ovocytaire de nombreuses espèces de téléostéens (Zhu et al., 2003a; Kazeto et al., 2005; Mourot et al., 2006; Tokumoto et al., 2006). Ces récepteurs au nombre de trois (α , β et γ) représentent une nouvelle classe de RCPG déclenchant une réponse rapide (non génomique) aux stéroïdes (Zhu et al., 2003b; Thomas et al., 2006). Le récepteur α serait impliqué dans la maturation méiotique ovocytaire (Zhu et al., 2003a). Toutefois, Thomas et ses collaborateurs (2004) ont montré que les récepteurs β peuvent également être impliqués chez le poisson zèbre, *Danio rerio*. La fixation du MIS sur son récepteur provoquera l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC ; Gi), une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) et la formation du facteur MPF ou *Maturation Promoting Factor*. C'est le principal inducteur de la phase mitotique du cycle cellulaire chez tous les eucaryotes.

ETAT DE L'ART

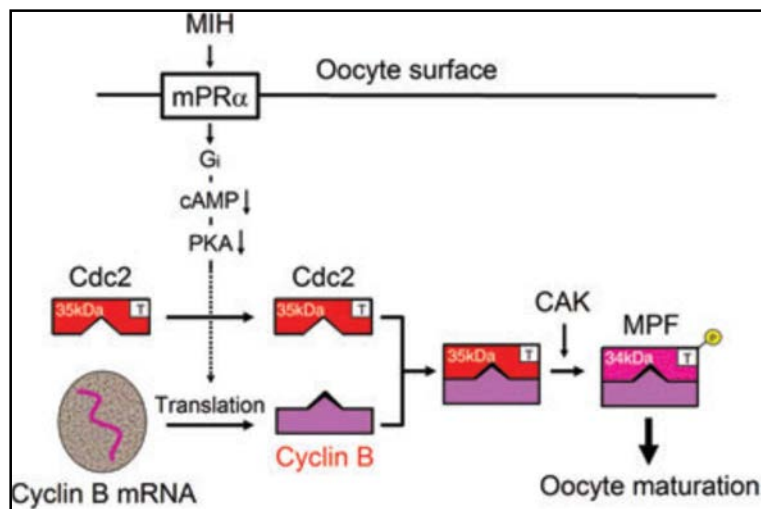


Figure 7 : Voie de biosynthèse et d'activation du MPF (Maturation Promoting Factor) suite à la fixation du MIS (MIH, Maturation-Induced-Steroid/Hormone) sur son récepteur (d'après Nagahama et Yamamoto, 2008).

Il est composé de deux sous-unités, une sous unité catalytique cdc2 ou *cyclin-dependent protein kinase Cdk1*, et une sous unité régulatrice, la cycline B. La fixation du MIS sur son récepteur permettra la synthèse de novo de cycline B qui se liera ensuite à la cdc2 pour former le MPF qui sera ensuite activé (Figure 7; Nagahama et Yamashita, 2008). Suite à cela, débutera la phase de maturation méiotique ovocytaire avec l'expulsion du premier globule polaire et les différents événements cytoplasmiques. Toutefois, chez le Tambour brésilien, il a été montré que la voie de signalisation de la phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate kinase (PI3kinase)/Akt, en association à la voie AMPc/Protéine Kinase A (PKA), est nécessaire à la production du MPF (Pace et Thomas, 2005).

Bien qu'il ne soit pour l'instant pas impliqué lors de la maturation méiotique ovocytaire, il est intéressant de notifier que le MIS possède également un récepteur nucléaire. Il a été découvert chez l'Acoupa pintade, *Cynoscion nebulosus*, et serait responsable de l'effet génomique du MIS lors de l'ovulation (Pinter et Thomas, 1995).

2.2.1.2.1. Les concentrations plasmatiques de progestagènes

Les progestagènes sont produits lors des phases finales de l'ovogenèse (Kime, 1993). Toutefois, selon les espèces de téléostéens de fortes différences de concentration sont observées. En effet, comme cela a été observé pour la T et l'E₂, les femelles de perciformes

ETAT DE L'ART

semblent posséder des concentrations de progestagènes très faibles par rapport aux salmonidés et cyprinidés. Les niveaux de DHP peuvent augmenter jusqu'à 148 ng/mL chez le saumon de fontaine, *Salvelinus fontinalis* (Goetz et al., 1987) et 300 ng/mL chez la truite arc-en-ciel (Fostier et Jalabert, 1986) au cours de la période pré-ovulatoire (stade GVBD) alors que des taux 50-500 fois inférieurs ont été obtenus chez le bar européen (Prat et al., 1990; Asturiano et al., 2000), le bar d'Amérique, *Morone saxatilis* (King et al., 1994a; Mylonas et al., 1998), le bar blanc, *Morone chrysops*, et le bar blanc d'Amérique (King et al., 1995), le sandre américain (Barry et al., 1995), la perche européenne (Sulistyo et al., 1998; Migaud et al., 2003b). Comme chez certains salmonidés (Goetz et Theofan, 1979; Fostier et Jalabert, 1986), cette élévation de MIS en période pré-ovulatoire a également été observée chez d'autres espèces tels que des perciformes (King et al., 1994a, 1995; Asturiano et al., 2000; Migaud et al., 2003b). Elle s'effectuerait autour de la GVBD chez certains moronidés (King et al., 1994a, 1995). Toutefois, cette élévation très rapide va également disparaître très vite pouvant rendre la détection de ce pic difficile chez de nombreuses espèces (Prat et al., 1990; Sulistyo et al., 1998; Migaud, 2002; Migaud et al., 2003b). Par exemple, chez la perche européenne, aucune variation des niveaux de DHP n'a été observée au cours de la période pré-ovulatoire par l'équipe de Sulistyo et al., (1998) alors qu'une autre étude a permis de mettre en évidence un pic pré-ovulatoire jusqu'à 4 ng/mL chez cette même espèce (Migaud et al., 2003b). Chez un pondéur multiple tel que le bar européen, il est intéressant de noter qu'un pic de chaque progestagène (la DHP et la 20 β -S) a été détecté au cours du cycle, à la toute fin de la vitellogenèse avant le début de la maturation méiotique ovocytaire pour la DHP et juste avant l'ovulation pour la 20 β -S (Asturiano et al., 2000). Chez le sandre, une augmentation des concentrations plasmatiques de DHP (jusqu'à 4-5 ng/mL) semble également être observée à la fin de la vitellogenèse (trois semaines avant l'ovulation ; Khendek et al., 2018).

En dehors de ces progestagènes, certains corticostéroïdes tels que le cortisol ou la 11-déoxycorticostérone (DOC) réguleraient certains mécanismes pré-ovulatoires tels que l'induction de la maturation méiotique ovocytaire (Milla et al., 2009b).

Toutefois, il est important de noter que les connaissances sur l'endocrinologie de la reproduction restent très limitées chez les percidés et en particulier chez le sandre par rapport à d'autres téléostéens.

ETAT DE L'ART

2.2.2. Le niveau hypophysaire et les gonadotropines

2.2.2.1. Synthèse

Deux gonadotropines, la FSH et la LH ont été identifiées chez différentes espèces de téléostéens (Suzuki et al., 1988b; Van der Kraak et al., 1992; Koide et al., 1993; Okada et al., 1994; García-Hernández et al., 1997; Weltzien et al., 2003). Elles sont produites au sein des cellules gonadotropes de l'adénohypophyse ou hypophyse antérieure. A la différence des autres espèces de vertébrés, les téléostéens ne possèdent pas de système porte entre l'hypothalamus et l'hypophyse. Ainsi, le cerveau envoie des projections neuronales directement au niveau de l'hypophyse antérieure. Bien que d'autres régions cérébrales contiennent quelques-uns de ces neurones hypophysiotropiques, ces projections sont majoritairement issues de l'aire pré-optique et de l'hypothalamus médiobasal (Zohar et al., 2010).

La GnRH fait partie des sécrétagogues majeurs dans la régulation de l'activité hypophysaire. Celle-ci stimule la production et la libération des deux gonadotropines. Ces deux molécules sont constituées d'une sous unité α , commune aux deux formes et d'une sous unité β , spécifique de chacune et leur conférant leur activité biologique (Swanson et al., 2003; Yaron et al., 2003; Levavi-Sivan et al., 2010).

2.2.2.2. Modes d'action et rôles

Ces molécules agissent sur deux types de récepteurs membranaires (RCPG) présents dans les cellules folliculaires (Yan et al., 1992; Miwa et al., 1994). Les récepteurs de la LH (récepteur de type II) ne seraient présents que dans les cellules de la granulosa du follicule pré-ovulatoire alors que les récepteurs de la FSH (récepteur de type I) seraient présents dans les deux types de cellules pour le follicule en cours de vitellogenèse et en période pré-ovulatoire (Yan et al., 1992; Miwa et al., 1994). Suite à plusieurs études chez différentes espèces, il a été proposé que le récepteur à la FSH, selon l'espèce concernée, pourrait se lier aux deux gonadotropines alors que celui de la LH n'interagirait qu'avec le ligand du même nom (Yan et al., 1992; Miwa et al., 1994; Levavi-Sivan et al., 2010).

La fixation des gonadotropines sur leur récepteur active la voie de signalisation AMPc/PKA permettant la stimulation de la croissance et du développement des cellules germinales et des gonades via la synthèse d'hormones dont les stéroïdes sexuels (Planas et Swanson, 2008; Clelland et Peng, 2009).

ETAT DE L'ART

2.2.2.3. Les gonadotropines au cours du cycle

Pour les téléostéens possédant un développement ovarien synchrone comme le sandre, les deux gonadotropines agissent de façon décalée dans le temps comme chez les salmonidés (Yaron et al., 2003; Figure 8). La FSH serait associée à la première partie du cycle c'est à dire

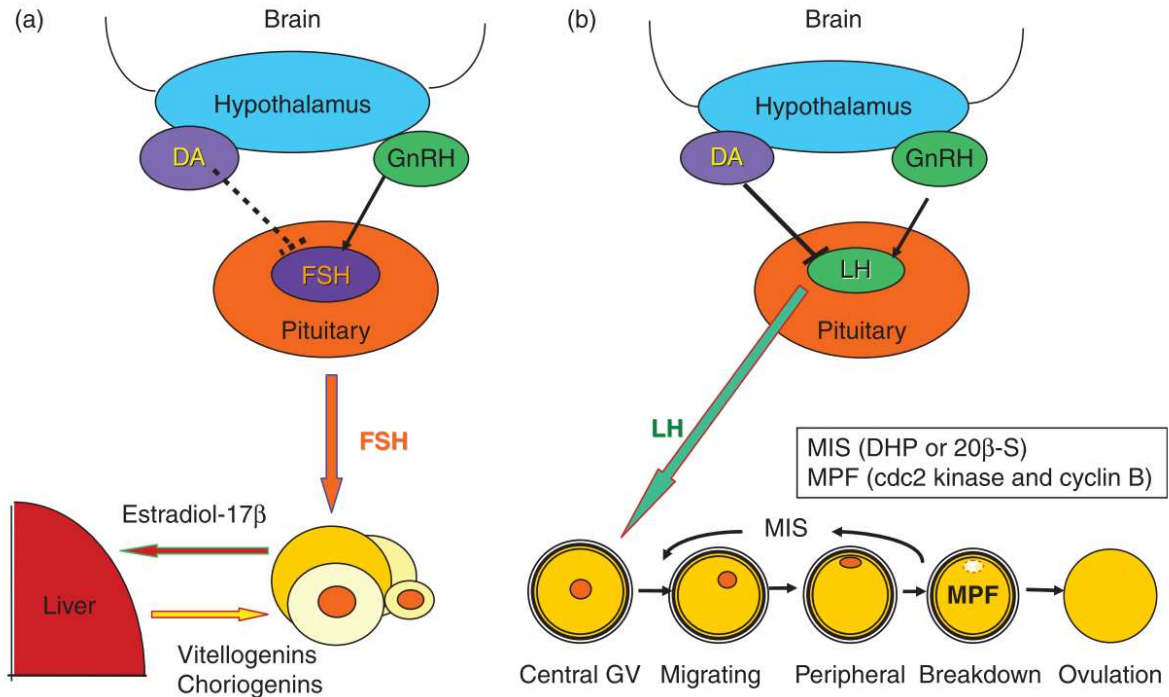


Figure 8 : Régulation de la gamétogenèse par l'axe gonadotrope et notamment les gonadotropines a) lors de la vitellogenèse et b) lors des phases finales. DA, dopamine ; GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone ; FSH, Follicle Stimulating Hormone ; LH, Luteinizing Hormone ; MPF, Maturation Promoting Factor ; MIS Maturation-Induced-Steroid (d'après Yaron et Levavi-Sivan, 2011).

aux stades de croissance ovocytaire et de vitellogenèse alors que la LH serait impliquée lors des phases finales de l'ovogenèse (Suzuki et al., 1988a; Swanson et al., 1991; Yaron et al., 2003). En effet, au début du cycle la synthèse de FSH augmente pour rester constante tout le long de la vitellogenèse et fini par diminuer juste avant la maturation méiotique ovocytaire alors que la synthèse de LH augmente durant les phases finales jusqu'à son pic ovulatoire (Weil et al., 1995; Prat et al., 1996; Swanson et al., 2003; Yaron et al., 2003; Levavi-Sivan et al., 2010). Chez la truite arc en ciel, un pic de FSH peut également être observé pendant la maturation méiotique ovocytaire au même moment que le pic de LH. Ce pic de FSH serait

ETAT DE L'ART

impliqué dans le recrutement des ovocytes pour le prochain cycle (Prat et al., 1996; Swanson et al., 2003).

2.2.2.4. La régulation des gonadotropines

Parmi les régulateurs des gonadotropines se trouvent un certain nombre de facteurs cérébraux que nous développerons plus en détails dans les prochaines parties (*Cf. parties 2.2.3 et 2.2.4*). Ensuite, selon les moments du cycle, les stéroïdes sexuels vont effectuer des rétrocontrôles positifs ou négatifs soit au niveau hypothalamique, soit directement au niveau hypophysaire (*Cf. partie 2.2.1*). Pour finir, le système activine-inhibine-follistatine serait également impliqué dans la régulation paracrine des gonadotropines et notamment dans la libération de la LH (Ge et al., 1992; Ge, 2000).

Parmi les nombreuses molécules qui vont pouvoir réguler l'activité hypophysaire et notamment la synthèse et la libération de la LH se trouvent les molécules de GnRH.

Au niveau hypophysaire, les phases finales seraient donc majoritairement régulées par la LH. Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons donc essentiellement à cette gonadotropine.

2.2.3. Le niveau cérébral, les GnRHs et autres facteurs cérébraux

2.2.3.1. Les GnRHs

2.2.3.1.1. Les différentes formes de GnRH

Les molécules de GnRHs sont des décapeptides très conservés entre les espèces et faisant parti d'une famille regroupant près de 8 isoformes différentes chez les téléostéens (Lethimonier et al., 2004; Tableau 2). A l'exception de la GnRH initialement découverte chez les mammifères ou mGnRH (Matsuo et al., 1971) et celle découverte chez la poule ou cGnRH (Miyamoto et al., 1984), les six autres formes de GnRH prennent le nom de l'espèce de téléostéens chez qui elles ont été identifiées.

Chaque espèce de téléostéens peut posséder deux ou trois formes. La cGnRH, GnRH-II ou *GnRH-2* (pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂; Yu et al., 1988) serait exprimée chez tous les téléostéens (Millar, 2003; Lethimonier et al., 2004).

ETAT DE L'ART

Chez les perciformes, trois formes de GnRH seraient retrouvées et réparties en trois populations neuronales (Lethimonier et al., 2004):

- *Au niveau du tegmentum du mésencéphale* : la GnRH-2,
- *Au niveau de la partie antérieure du télencéphale avec le bulbe olfactif*: la GnRH de saumon (sGnRH ou GnRH-III, *GnRH-3* ; pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH₂ ; Sherwood et al., 1983) et,
- *Au niveau du télencéphale ventral contenant l'aire préoptique*: la GnRH spécifique de l'espèce (GnRH-I ou *GnRH-1*) qui serait celle identifiée pour la première fois chez la dorade, *Sparus aurata* (sbGnRH pour *seabream GnRH*; pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂; Powell et al., 1994).

Tableau 2 : Séquences protéiques des différentes formes de GnRH identifiées chez les vertébrés (d'après Lethimonier et al., 2004)

<i>Teleosts</i>											
Mammalian GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂	Matsuo et al. (1971)
Chicken GnRH-II	—	—	—	—	His	—	Trp	Tyr	—	—	Yu et al. (1988)
Pejerrey GnRH	—	—	—	—	Phe	—	—	Ser	—	—	Montaner et al. (2001)
Seabream	—	—	—	—	—	—	—	Ser	—	—	Powell et al. (1994)
Salmon GnRH	—	—	—	—	—	—	Trp	Leu	—	—	Sherwood et al. (1983)
Catfish GnRH	—	—	—	—	His	—	—	Asn	—	—	Bogerd et al. (1992)
Herring GnRH	—	—	—	—	His	—	—	Ser	—	—	Carolsfeld et al. (2000)
Whitefish GnRH	—	—	—	—	—	—	Met	Asn	—	—	Adams et al. (2002)
<i>Other vertebrates</i>											
Mammalian GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂	King et al. (1990)
Frog GnRH	—	—	—	—	—	—	—	Trp	—	—	Yoo et al. (2000)
Lamprey GnRH-I	—	—	Tyr	—	Leu	Glu	Trp	Lys	—	—	Sower et al. (1993)
Lamprey GnRH-III	—	—	—	—	His	Asp	Trp	Lys	—	—	Sower et al. (1993)
Dogfish GnRH	—	—	—	—	His	—	Trp	Leu	—	—	Lovejoy et al. (1992)
Guinea pig GnRH	—	Tyr	—	—	—	—	Val	—	—	—	Jimenez-Linan et al. (1997)
Chicken GnRH-I	—	—	—	—	—	—	—	Gln	—	—	Miyamoto et al. (1982)

Bien que cette régionalisation de l'expression des trois formes de GnRH ait été confirmée chez plusieurs espèces de perciformes, une étude utilisant de l'hybridation *in situ* chez le bar européen la confirme mais montre que la distribution de l'expression de la prepro-GnRH-3 et de la prepro-GnRH-1 est beaucoup plus vaste, caractérisée notamment par un chevauchement de leur expression dans le cerveau antérieur (Gonzalez-Martinez et al., 2001).

Enfin, compte tenu de la distribution cérébrale des trois formes de GnRH chez la majorité des espèces, un consensus serait établi considérant que la forme exprimée au niveau de l'aire préoptique est la forme hypophysiotrophique principale, c'est-à-dire la forme régulant la sécrétion hypophysaire. La GnRH-2 aurait plus un rôle neuro-régulateur ou paracrine

ETAT DE L'ART

influençant la reproduction de façon indirecte alors que la GnRH exprimée dans le bulbe olfactif régulerait le comportement reproducteur tel que la migration (Steven et al., 2003; Chang et al., 2009). Malgré ce consensus, les deux formes existantes chez le poisson rouge, *Carassius auratus*, seraient impliquées dans la fonction hypophysiotropique. Il est même suggéré que la GnRH-2 le serait également chez d'autres espèces (Chang et al., 2009). En 2010, Zohar et son équipe proposent que l'expression de la GnRH-1 serait étroitement liée à l'activité de reproduction chez l'adulte et que la GnRH-2 et 3 posséderaient des rôles neuroendocriniens différents des fonctions hypophysiotropiques connues au cours du cycle reproducteur (Zohar et al., 2010). Toutefois, la GnRH-3 enverrait quelques projections neuronales au niveau de l'hypophyse suggérant son implication dans la régulation des sécrétions hypophysaires notamment de la LH (González-Martínez et al., 2002; Levavi-Sivan et al., 2004; Kah et al., 2007). Chez le sandre immature, une étude qui a comparé les niveaux des ARNm des GnRH-1 et GnRH-2 dans l'hypothalamus après l'application de deux molécules (leptine et kisséptine) propose que la GnRH-2 soit la forme responsable de l'activité hypophysiotropique (Schaefer et Wuertz, 2016).

2.2.3.1.2. Synthèse

Initialement, ces différentes isoformes sont toutes exprimées sous la forme d'un précurseur unique, la prépro-GnRH (Figure 9). Ce précurseur contient un peptide signal, le

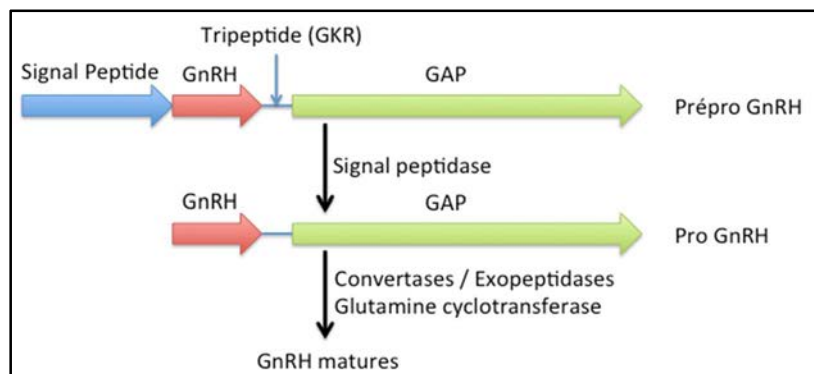


Figure 9 : Principales étapes du processus de maturation des molécules de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). GAP, GnRH-Associated Peptide (schéma personnel).

décapeptide mature, un tripeptide composé des acides aminés Glycine-Lysine-Arginine (GKR) et enfin un peptide associé à la GnRH appelé GAP. Cette prépro-GnRH va subir un certain nombre de modifications, à la fois dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi des

ETAT DE L'ART

corps cellulaires des neurones à GnRH pour former successivement la pro-GnRH puis le décapeptide proprement dit. Le peptide mature ainsi que le peptide GAP seront regroupés dans des vésicules de sécrétion (granules sécrétoires) qui les transporteront jusqu'aux terminaisons axonales (Rangaraju et al., 1991; Zohar et al., 2010).

2.2.3.1.3. Modes d'action

Ces molécules interviendront par l'intermédiaire de différents récepteurs de la famille des RCPG exprimés dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse chez le poisson rouge (Canosa et al., 2007). Au moins deux types de récepteurs ont été identifiés (Lethimonier et al., 2004). En raison des rétrocontrôles exercés par les gonadotropines et les stéroïdes sexuels, le niveau d'expression de ces différents récepteurs est variable en fonction du sexe et de l'avancée dans le cycle de reproduction (Levavi-Sivan et al., 2006; Clelland et Peng, 2009).

Les voies de signalisation de ces récepteurs ont été très bien étudiées chez le poisson rouge chez qui deux formes de GnRH, la sGnRH et la cGnRH existent (Chang et al., 2009; Figure 10). Au travers de ces récepteurs, les deux formes activent la voie de la phospholipase C (PLC) déclenchant l'activation de la protéine kinase C (PKC) et l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Chang et al., 2000; Yaron et al., 2003; Levavi-Sivan et Avitan, 2005; Gopurappilly et al., 2013). Suite à la libération de Ca^{2+} dans la cellule, ce dernier est capté par la voie des calmodulines (CAM)/CAM kinases qui vont stimuler la libération de LH (Chang et al., 2000). De plus, la sGnRH serait également capable d'activer une voie indépendante du Ca^{2+} , la voie de la phospholipase A2 et de l'acide arachidonique déclenchant la libération de LH par l'intermédiaire de la lipooxygénase (Chang et al., 1996, 2000). L'implication de la voie AMPc/PKA est incertaine. Elle participerait à la libération de la LH induite par la GnRH chez certaines espèces telles que le tilapia ou le poisson-chat africain (Chang et al., 1996, 2009). Chez le poisson rouge, cette voie de signalisation ne serait pas impliquée, ou seulement de façon indirecte dans cet effet de la GnRH sur la libération de la LH (Chang et al., 1992, 1996). Chang et son équipe ont montré que l'élévation de l'AMPc permettrait d'accroître la libération de la LH suite à la stimulation par les GnRHs et la PKC notamment en régulant positivement les canaux calciques (Chang et al., 1992, 2000). De plus, elle pourrait également jouer un rôle important dans la régulation de la sensibilité de la GnRH à d'autres molécules régulatrices telles que la DA (Cf. *Partie 2.2.4*; Chang et al., 2000). Enfin,

ETAT DE L'ART

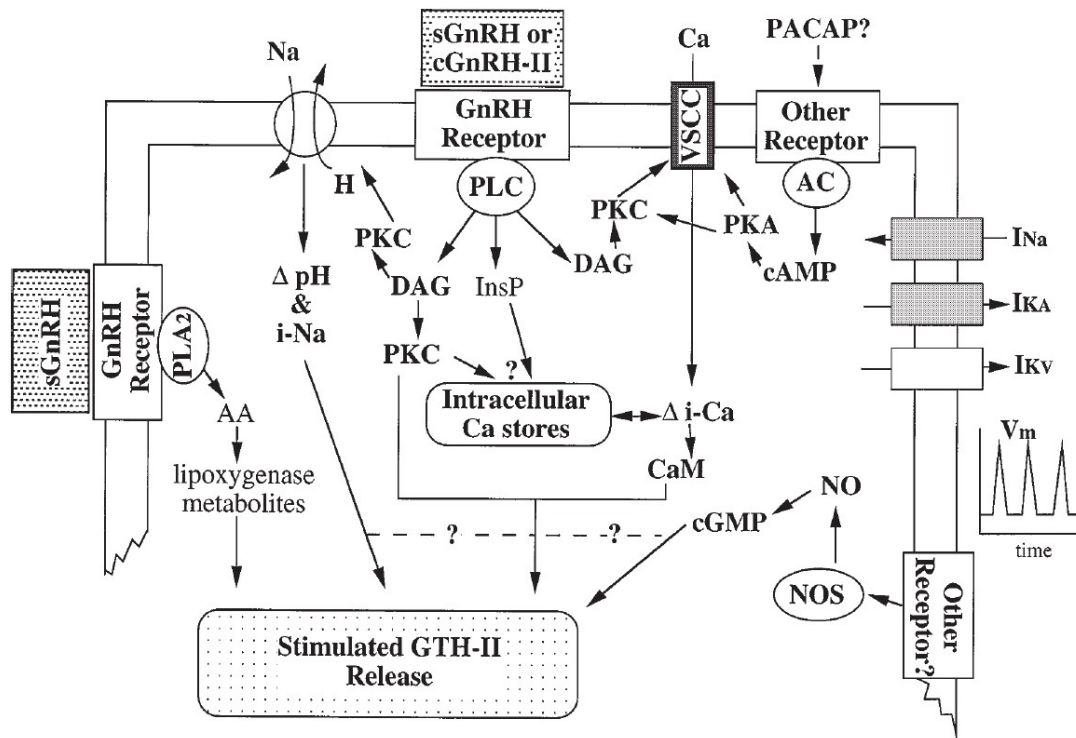


Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par les molécules de GnRH au sein des cellules gonadotropes du poisson rouge. AA, Acide arachidonique ; AC, Adénylate Cyclase ; CaM, Calmodulines ; cAMP, cyclic Adenosine MonoPhosphate ; DAG, Diacylglycérol ; s ou cGnRH, salmon ou chicken Gonatropin Releasing Hormone ; GTH-II, Gonadotropin hormones II (LH) ; InsP, Inositol trisphosphate ; PKA, Protéine Kinase A ; PKC, Protéine Kinase C ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; PLC, Phospholipase C (d'après Chang et al., 2000).

d'autres auteurs ont montré que des transporteurs Na⁺/H⁺ seraient également impliqués dans la libération de la LH (Van Goor et al., 1996).

Chez le sandre, les différentes formes de GnRH responsables de la régulation de la gamétogenèse et notamment des phases finales n'ont jamais été caractérisées.

Au niveau cérébral, les GnRHs ne sont pas les seules molécules régulatrices des phases finales de la gamétogenèse. D'autres molécules vont intervenir et interagir pour réguler ces phases finales.

ETAT DE L'ART

2.2.3.2. Les autres facteurs cérébraux

La régulation de la gamétogenèse et notamment des phases finales fait intervenir des mécanismes complexes encore loin d'être totalement connus. Parmi ces mécanismes, nous trouvons la libération, par les neurones hypothalamiques, d'un certain nombre de molécules au niveau hypophysaire pour possiblement stimuler la libération de la LH. C'est le cas par exemple du NPY, de la bombésine, de la cholécystokinine (CCK) et de la galanine (Himick et al., 1993, 1996; Peng et al., 1993; Anglade et al., 1994; Himick et Peter, 1995; Power et al., 1996; Trudeau, 1997; Chang et al., 2009).

D'autres molécules agissent de façon plus indirecte pour stimuler la libération de la LH. Par exemple, elles interagissent avec d'autres molécules cérébrales ou avec les neurones à GnRH. C'est le cas de la molécule GABA, de la taurine, de la NMDA ou *N-Méthyl-D, L-Aspartic acid* qui est un agoniste du glutamate (Trudeau, 1997). Le GABA stimulerait la libération de LH en augmentant la sécrétion mais également en potentialisant les effets de la GnRH et en diminuant l'activité dopaminergique. Dans certains cas, le GABA pourrait également stimuler directement les cellules gonadotropes (Trudeau, 1997; Trudeau et al., 2000). Comme le GABA, la noradrénaline (ou norépinéphrine ; NE), la sérotonine et le NPY pourraient également exercer leur régulation positive sur la sécrétion de la GnRH (Yu et al., 1991; Peng et al., 1993; Trudeau, 1997).

Au début des années 2000, après avoir été découvert chez les mammifères, un système Kiss/Kissr a aussi été mis en évidence chez les téléostéens (Van Aerle et al., 2008). Chez ces derniers, un deuxième gène Kiss, *Kiss2* a été identifié (Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009). Chez le tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*, il a été montré que le récepteur Kiss1r (GPR54) est associé au système GnRH (Parhar et al., 2004). En effet, Gopurapilly et ses collaborateurs rapportent que le système Kiss1/GPR54 régule la sécrétion de GnRH (Gopurappilly et al., 2013). En 2008, Kanda et son équipe ont montré que parmi les deux populations neuronales localisées dans l'hypothalamus exprimant le gène Kiss1, l'une était régulée positivement par l'E₂ (Kanda et al., 2008). Par ailleurs, Felip et al en 2009 ont montré que bien que le Kiss1 puisse stimuler la libération de la LH, la molécule Kiss2 est la seule à stimuler la synthèse de la LH et la libération des deux gonadotropines (Felip et al., 2009). Par conséquent, il serait possible que ce système intervienne également dans la régulation de l'axe gonadotrope chez le poisson comme il le fait chez les mammifères (Navarro et al., 2005a, b; Felip et al., 2009).

ETAT DE L'ART

La mélatonine, produite par la glande pinéale, a également été suggérée comme régulatrice de la reproduction chez les téléostéens. En effet, chez le mâle de saumon du Japon, *Oncorhynchus masou*, l'injection de mélatonine a diminué l'indice gonado-somatique, les concentrations plasmatiques de T ainsi que le contenu hypophysaire en sGnRH et en LH (Amano et al., 2004). Par ailleurs, une autre équipe a montré qu'un traitement de longue durée avec de la mélatonine chez l'anguille d'Europe, *Anguilla anguilla*, diminuait l'expression des gonadotropines et la production de stéroïdes sexuels, mais également augmentait l'expression dans l'aire préoptique de la tyrosine hydroxylase, l'enzyme de synthèse de la DA. Ainsi, la mélatonine aurait un effet négatif sur les hormones de l'axe gonadotrope (Sébert et al., 2008a). Toutefois, une autre équipe a montré que l'injection de mélatonine chez la carpe commune mature, *Cyprinus carpio*, stimulerait la libération de LH en inhibant la libération de la DA dans l'hypothalamus (Dufour et al., 2010). Ainsi, la mélatonine peut avoir un effet positif ou négatif sur l'axe gonadotrope.

Depuis plusieurs années, des études ont montré qu'une autre molécule serait impliquée dans la régulation de la reproduction chez les téléostéens, la GnIH pour *Gonadotropin-Inhibitory Hormone*. C'est un neuropeptide hypothalamique de la famille des RFamides qui est issu du clivage d'un précurseur polypeptidique, la prépro-GnIH. Selon l'espèce de téléostéens, ce précurseur polypeptidique contiendrait la séquence de deux ou trois peptides de cette famille qui sont retrouvés sous le terme *LPXRFamide* ou *LPXRFamide-like peptides* (Muñoz-Cueto et al., 2017). En formant un complexe GnIH/récepteur de la GnIH (GnIHR), ces peptides vont pouvoir exercer différentes actions au niveau hypophysaire ou cérébral. Par exemple, un effet stimulateur de la GnIH sur la libération des gonadotropines chez le saumon rouge, *Onchorhynchus nerka* (*in vitro* ; Amano et al., 2006) ou le tilapia du Nil (*in vitro* et *in vivo* ; Biran et al., 2014) a été observé. A l'opposé, Zhang et son équipe ont montré que l'injection de GnIH inhibait la libération de LH chez le poisson rouge (Zhang et al., 2010). D'autres études ont mis en évidence que la GnIH régula également la synthèse des gonadotropines et des différentes formes de GnRH. Par exemple, chez le poisson rouge, l'injection de GnIH a diminué les niveaux d'ARNm de la GnRH-3 dans l'hypothalamus et des gonadotropines dans l'hypophyse (Qi et al., 2013). Au contraire, les niveaux hypothalamiques d'ARNm de la GnRH-3 ont été augmentés par la GnIH chez le mérrou à tâches orange, *Epinephelus coioides* (Wang et al., 2015). Ces derniers ont également observé que l'injection de GnIH inhibait la

ETAT DE L'ART

synthèse de la LH β dans l'hypophyse et de la GnRH-1 dans l'hypothalamus. Ainsi, chez les téléostéens, selon l'espèce ou le peptide étudié(e), le système à GnIH peut exercer un effet stimulateur ou inhibiteur sur l'axe gonadotrope.

Enfin, une autre molécule est impliquée négativement dans la reproduction de certaines espèces de téléostéens et notamment lors des phases finales, la DA.

2.2.4. La dopamine

2.2.4.1. Synthèse et dégradation

La DA, comme l'adrénaline et la noradrénaline, est une catécholamine qui est très répandue dans le système nerveux central des vertébrés (Smeets et Gonzalez, 2000; Sébert et al., 2008b). Elle est également produite au niveau périphérique par les fibres nerveuses du système nerveux sympathique, dans la médulla des glandes surrénales ainsi que dans les cellules neuroendocrines qui sont, par exemple, trouvées dans les reins et le pancréas (Rubí et Maechler, 2010).

Les processus de synthèse et de dégradation des catécholamines sont très conservés chez les vertébrés (Sébert et al., 2008b). Dans les neurones dopaminergiques, la DA est synthétisée à partir de l'acide aminé tyrosine (1) selon le schéma de synthèse présentée Figure 11. Ce dernier sera hydroxylé (2) en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase (TH). Cette réaction enzymatique constitue l'étape limitante de cette voie de biosynthèse (Levitt et al., 1965). La L-DOPA sera ensuite décarboxylée en DA par l'enzyme L-amino acide décarboxylase (AADC) appelée plus couramment DOPA décarboxylase (3), et incorporée dans des vésicules de stockage (4) jusqu'à sa libération (5). Une fois libérée, la fraction qui ne se lie pas à ses récepteurs dopaminergiques (6) sera soit récupérée rapidement par un transporteur pré-synaptique (7), désaminée et transformée en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) à l'aide de deux enzymes, la monoamine oxydase (MAO) et l'aldéhyde déshydrogénase (70%, (8)), soit inactivée par l'enzyme catéchol-O-méthyl transférase (COMT, (9)) (Sébert et al., 2008b; Yamamoto et Vemier, 2011).

ETAT DE L'ART

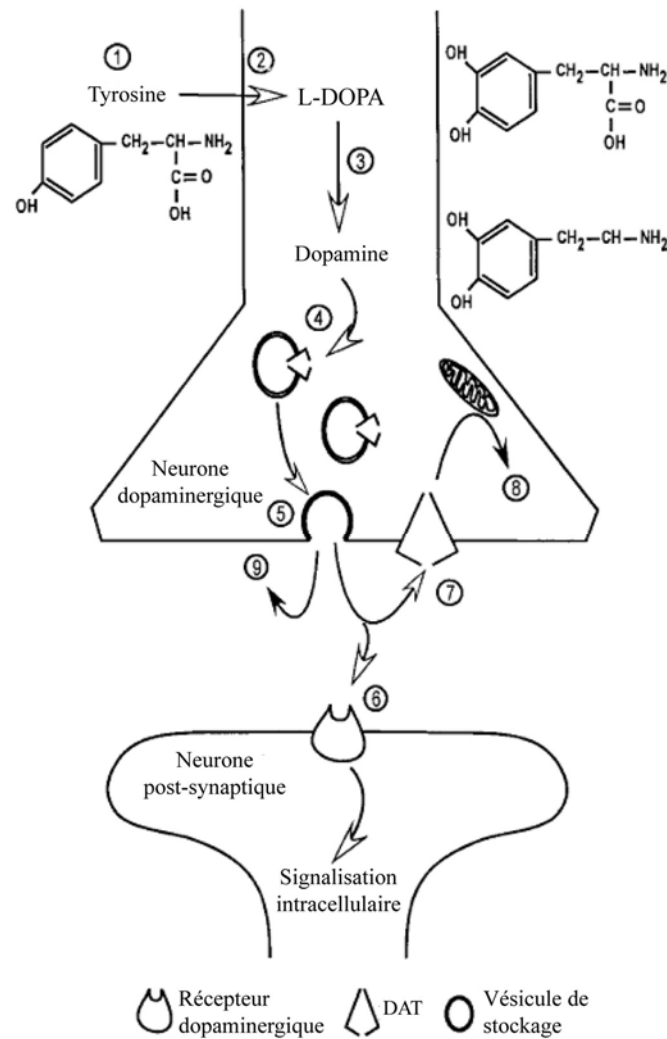


Figure 11 : Voies de biosynthèse, de libération et du catabolisme de la dopamine. L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine ; DAT : Transporteur de la dopamine (modifiée d'après Ben-Jonathan et Hnasko, 2001)

2.2.4.2. Rôles

Chez les vertébrés, la DA est impliquée dans un grand nombre de fonctions. Par exemple, elle est impliquée dans la mémorisation, la perception sensorielle, le sommeil, le contrôle des comportements émotionnels, reproducteurs et maternels, la respiration, la régulation du glucose, la locomotion, la thermorégulation, la régulation de la prise alimentaire ainsi que la régulation des sécrétions hypophysaires (Missale et al., 1998; Le Crom, 2000; Rubí et Maechler, 2010). En effet, chez certains téléostéens, la DA est impliquée dans la régulation de la LH hypophysaire lui permettant de contrôler différentes étapes de la gamétogenèse. Par exemple, chez l'anguille d'Europe prépubère, la DA empêche non seulement la synthèse et la

ETAT DE L'ART

libération de la LH suite à la stimulation par la GnRH mais également le développement ovarien. En effet, le blocage de cette inhibition dopaminergique stimule la vitellogénèse et la production de Vitellogénine (Vidal et al., 2004). Chez le mulot cabot, *Mugil cephalus*, cette inhibition dopaminergique a également été observée au cours de cette période du cycle. Elle freinerait le développement ovocytaire ainsi que la production d'E₂ (Aizen et al., 2005). Chez cette espèce, en plus d'être impliquée dans le contrôle des premières étapes de la gamétogenèse, la DA est également impliquée dans celui des phases finales (maturation méiotique ovocytaire et ovulation). En effet, chez un grand nombre de téléostéens, la DA inhibe la sécrétion basale de la LH et suite à la stimulation par la GnRH lors de la période pré-ovulatoire (Chang et Peter, 1983; Dufour et al., 2005, 2010; Chang et al., 2009; Zohar et al., 2010). Selon l'espèce, l'intensité de cette inhibition dopaminergique et son moment d'action varient en fonction de la stratégie de reproduction (Mañanós et al., 2008). Cette inhibition peut être totale et empêcher l'ovulation en freinant l'élévation de LH comme nous pouvons l'observer chez des cyprinidés, salmonidés, siluridés et quelques perciformes comme les tilapias (Mañanós et al., 2008; Dufour et al., 2010). Aussi, elle peut être faible ou complètement absente comme chez le tambour brésilien (Copeland et Thomas, 1989) ou encore chez la dorade (Dufour et al., 2010).

2.2.4.3. Les récepteurs

Les récepteurs de la DA ont été largement décrits chez les mammifères. La DA se fixe sur deux familles distinctes de récepteurs membranaires (RCPG), la famille D₁ qui contient les récepteurs D₁ et D₅, autrement nommés D_{1A} et D_{1B} chez les mammifères non humains et la famille D₂ qui contient les récepteurs D₂, D₃ et D₄. Chaque récepteur est codé par un gène (Kebabian et Calne, 1979; Missale et al., 1998). Leur différence d'organisation génique (présence d'introns ou non) permet de distinguer les deux familles de récepteurs (Missale et al., 1998; Yamamoto et al., 2015). La présence d'introns dans les gènes de la famille D₂ leur permet de subir un épissage alternatif au moment de la maturation post-transcriptionnelle et de créer plusieurs variants protéiques à partir d'un même gène (Dal Toso et al., 1989; Monsma et al., 1989). Les deux familles se distinguent également l'une de l'autre par leur(s) propriété(s) de liaison à une protéine G spécifique (G_s/G_{olf} pour D₁ et G_i/G_o pour D₂), structurales (présence d'une longue ou d'une courte troisième boucle intracellulaire ou queue C-terminale; Figure 12), mais également par leurs propriétés pharmacologiques (liaison à un agoniste/antagoniste spécifique; Kebabian et Calne, 1979; Andersen et al., 1990; Missale et al., 1998; Le Crom et al., 2003; Callier et al., 2003; Yamamoto et al., 2015).

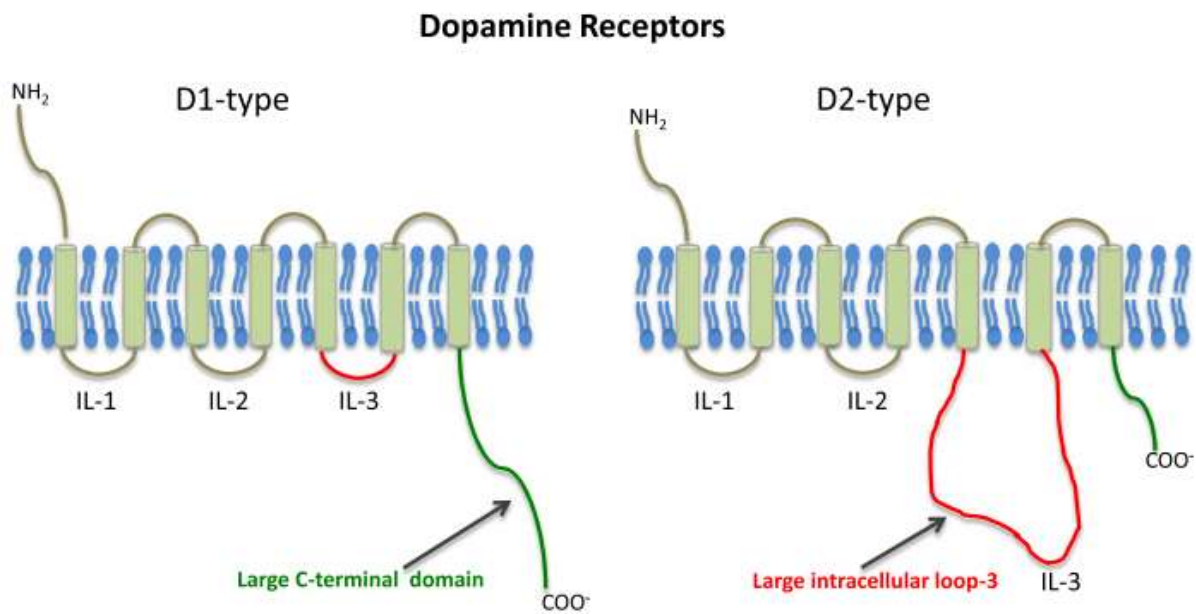


Figure 12 : Comparaison des différences générales dans la structure protéique des deux familles de récepteurs D₁ (D1-type) et D₂ (D2-type) de la dopamine chez les vertébrés (d'après Pandey et al., 2013)

Les agonistes et antagonistes de ces récepteurs sont extrêmement nombreux. Parmi tous les critères de classification des récepteurs, le critère pharmacologique est l'un des plus utilisés. Il existe de nombreuses molécules permettant de distinguer très facilement ces deux familles de récepteurs l'une de l'autre. (Missale et al., 1998; Le Crom, 2000). Pour donner des exemples, l'antagoniste spécifique de la famille D₁, le plus souvent utilisé, est le SCH23390 tandis que les composés de la famille des SKF tels que le SKF-38393 font partie des agonistes classiques. Pour la famille D₂, les molécules sont beaucoup plus nombreuses. Pour ne citer que quelques exemples, les antagonistes utilisés sont la métoclopramide (MCP), la dompéridone (DOM), le pimozide (PIM) ou encore la spipéronne. Parmi d'autres, le quinpirole et la bromocriptine représentent des agonistes classiques (Missale et al., 1998; Le Crom, 2000; Żarski et al., 2015b). La DA est le ligand naturel de ces deux familles de récepteurs. D'après Le Crom (2000), elle possède une affinité de l'ordre du micromolaire pour les récepteurs D₁ et du nanomolaire pour les récepteurs D₂. Au sein de chaque famille, à quelques exceptions près, la distinction spécifique de chaque sous-type reste encore difficile, notamment dans la famille D₁. En effet, aucun antagoniste ne permet de distinguer spécifiquement les sous-types D_{1A} et D_{1B}. Ce dernier a été caractérisé grâce à sa plus forte affinité pour la DA (Le Crom, 2000).

ETAT DE L'ART

En plus d'un rôle dans la distinction et l'étude des récepteurs dopaminergiques, ces molécules sont utilisées dans le traitement de certaines pathologies mais également dans l'induction de l'ovulation en aquaculture (*Cf. Partie 3.*).

De façon intéressante, on peut également noter que ces deux familles de récepteurs ne sont phylogénétiquement pas plus proche l'une de l'autre qu'elles ne le sont des récepteurs adrénérgiques ou sérotoninergiques (Le Crom et al., 2003; Callier et al., 2003). En outre, quand on remonte dans l'arbre évolutif des espèces, on s'aperçoit que les récepteurs de la DA sont beaucoup plus diversifiés chez les vertébrés. En effet, bien que les deux familles de récepteurs ainsi que les différentes caractéristiques énoncées précédemment sont conservées, le nombre de gènes et de sous-types de récepteurs est extrêmement différent selon les espèces. Cette même diversité est observée au sein des téléostéens (Yamamoto et al., 2015).

2.2.4.3.1. Pour la famille D₁

En plus des sous-types D_{1A} et D_{1B}, un troisième sous-type de récepteur a été identifié chez le xénope, *Xenopus laevis*, puis chez d'autres espèces de vertébrés, le D_{1C} (Sugamori et al., 1994; Lamers et al., 1996; Cardinaud et al., 1997; Hirano et al., 1998). Il est différent des deux premiers par sa séquence protéique, son profil pharmacologique et sa résistance à la désensibilisation des RCPG (Yamamoto et al., 2013). Un quatrième sous-type, le D_{1D} serait également présent chez les vertébrés mais sa présence a uniquement été démontrée chez les oiseaux (Demchyshyn et al., 1995; Kubikova et al., 2010). Celui-ci aurait un profil pharmacologique différent de D_{1C} et une identité de séquence protéique faible avec ce dernier. Chez le poisson zèbre et quelques espèces de sauropsidés, une forme supplémentaire nommée D_{1E} a été identifiée (Yamamoto et al., 2013). Enfin, une dernière forme la D_{1X} a été trouvée dans les cellules de la rétine chez la carpe commune (Hirano et al., 1998). Cette forme n'ayant pas été caractérisée pharmacologiquement et physiologiquement, elle est considérée comme *unidentified*, notamment dans beaucoup de bases de données ce qui a donné son nom D_{1X}. Cependant, cette dernière forme posséderait une séquence d'acides aminés spécifique, *RTCPLQHRAI* (Hirano et al., 1998; Yamamoto et al., 2015). En plus de ces formes supplémentaires, les téléostéens peuvent également posséder des gènes supplémentaires. Par exemple, en 1997, Cardinaud et son équipe ont montré que le sous-type D_{1A} peut être codé par deux gènes, nommés D_{1A1} et D_{1A2} chez l'anguille d'Europe (Cardinaud et al., 1997). Chez le

ETAT DE L'ART

poisson zèbre, les trois sous-types D_{1A} , D_{1B} et D_{1C} seraient chacun codés par deux gènes donnant les récepteurs D_{1Aa} et D_{1Ab} , D_{1Ba} et D_{1Bb} , D_{1Ca} et D_{1Cb} (Yamamoto et al., 2015). Cette complexité existante est renforcée par l'existence d'une nomenclature des récepteurs variable entre les études, ce qui rend encore plus confus leur classification chez les vertébrés.

Finalement, suite à plusieurs analyses phylogénétiques, Yamamoto et son équipe ont proposé une nouvelle classification des récepteurs de la famille D_1 . Le gène D_{1D} des oiseaux serait en fait un gène orthologue du gène D_{1C} , c'est-à-dire que ces deux gènes homologues sont issus d'un ancêtre commun. Ce terme est à opposer au terme paralogue qu'on emploie lorsque des gènes homologues sont apparus suite à une duplication génique. C'est d'ailleurs ce qui a été proposé pour le sous-type D_{1X} . Il serait un gène paralogue de D_{1B} probablement issu de la duplication du génome spécifique des téléostéens (3R). Par conséquent, il y aurait deux gènes D_{1B} , le D_{1Ba} (anciennement D_{1B}) et le D_{1Bb} (anciennement D_{1X}). Aussi, le gène D_{1D} serait renommé D_{1C} . Ainsi, Yamamoto propose que l'ancêtre commun des Ostéichthyens (poissons osseux) possédait au moins quatre gènes paralogues dans la famille D_1 , le D_{1A} , le D_{1B} , le D_{1C} et le D_{1E} et que certains de ces gènes auraient été perdus de façon indépendante chez certains vertébrés (Yamamoto et al., 2013, 2015).

2.2.4.3.2. Pour la famille D_2

Dans la famille D_2 , les trois sous-types de récepteurs, D_2 , D_3 et D_4 sont retrouvés. Chez la majorité des téléostéens, un seul gène codant pour le sous-type D_2 a été identifié (Hirano et al., 1998; Levavi-Sivan et al., 2005; Dufour et al., 2010). Toutefois, chez l'anguille d'Europe, le poisson zèbre, le poisson rouge ou encore la truite arc en ciel, deux ou trois gènes ont été identifiés (Vacher et al., 2003; Boehmler et al., 2004; Pasqualini et al., 2009; Popesku et al., 2011). Enfin, à la différence du sous-type D_3 qui serait codé par un seul gène, le sous-type D_4 serait codé par trois gènes D_{4a} , D_{4b} et D_{4c} (Boehmler et al., 2004, 2007).

Par l'utilisation d'analyses phylogénétiques de la famille D_2 , au lieu des trois clades attendus, D_2 , D_3 et D_4 , deux clades supplémentaires ont été obtenus, le D_{2l} ou *D_2 -like* et le D_{4rs} ou *D_4 -related sequence* (Yamamoto et al., 2015). En effet, Boehmler et son équipe ont observé que les gènes D_{2b} et D_{4b} étaient phylogénétiquement plus éloignés des deux autres gènes, D_{2a} et D_{2c} ainsi que D_{4a} et D_{4c} respectivement (Boehmler et al., 2004, 2007). Ainsi, comme pour la famille D_1 , une nouvelle classification a été proposée. La famille D_2 serait composée de cinq membres, D_2 , D_{2l} (anciennement D_{2b}), D_3 , D_4 et D_{4rs} (ancien D_{4b}) qui seraient présents chez l'ancêtre

ETAT DE L'ART

commun des Ostéichthyens. Les sous-types D₂ et D₄ seraient donc respectivement codés par deux gènes paralogues, D_{2a} et D_{2b} (anciennement D_{2c}) ainsi que D_{4a} et D_{4b} (ancien D_{4c}) chez le poisson zèbre (Yamamoto et al., 2015). A la différence des mammifères, l'existence d'un épissage alternatif chez les autres vertébrés et notamment les téléostéens, ne semble pas être généralisable. En effet, à notre connaissance, il n'a été observé que chez une espèce d'amphibien et de téléostéen (Nakano et al., 2010; Popesku et al., 2011).

2.2.4.3.3. La localisation des récepteurs

Il faut savoir que peu d'études se sont intéressées à la localisation tissulaire des différents récepteurs de la DA chez les téléostéens. Les quelques études existantes, mobilisant les techniques de (q)PCR ou d'hybridation *in situ*, ont montré une expression essentiellement cérébrale des gènes des récepteurs, avec des aires cérébrales montrant une expression différentielle pour chaque récepteur. Selon les études, ces récepteurs sont également exprimés dans certains tissus périphériques comme les ovaires, le foie ou les branchies (Cardinaud et al., 1997; Kapsimali et al., 2000b; Vacher et al., 2003; Levavi-Sivan et al., 2005; Pasqualini et al., 2009). Ce sujet ne sera pas plus développé dans cette introduction, le chapitre 2 de ce manuscrit étant consacré aux récepteurs de la DA.

2.2.4.4. Mécanismes d'actions et voies de signalisation

2.2.4.4.1. De manière générale

Les mécanismes mis en jeu par les récepteurs de la DA sont très nombreux, complexes et dépendent beaucoup du tissu où ils sont exprimés (Missale et al., 1998). Dans sa revue, basée sur des études menées chez les mammifères, Missale et ses collaborateurs expliquent que beaucoup ont mené à des résultats contradictoires notamment dû au système d'étude utilisé. Dans cette synthèse, le but n'est donc pas de faire une description exhaustive des voies de signalisation mais plutôt un résumé des mécanismes qui seraient potentiellement mis en jeu pour chaque famille (Figure 13).

Pour la famille des récepteurs D₁, les récepteurs peuvent activer l'AC et provoquer une augmentation de l'AMPc au travers du couplage à une protéine G_s ou G_{olf} (Missale et al., 1998; Callier et al., 2003). Dans certaines conditions, la voie de la PLC est activée permettant notamment d'augmenter la concentration de Ca²⁺ intracellulaire (Missale et al., 1998; Le Crom

ETAT DE L'ART

et al., 2003). Cette modulation du Ca^{2+} intracellulaire se ferait également par la voie de la PKA. De plus, les récepteurs D_1 interviendraient dans l'inhibition de l'activité du transporteur Na^+/H^+ responsable de la régulation du pH intracellulaire et du volume cellulaire par une voie à la fois dépendante et indépendante de l'AMPc. La pompe Na^+/K^+ ATPase serait aussi régulée mais les mécanismes restent très dépendants des tissus. Enfin, les récepteurs D_1 seraient capables d'inhiber la libération de l'acide arachidonique en réponse à une stimulation par le calcium impliquant sans doute la PKA (Missale et al., 1998).

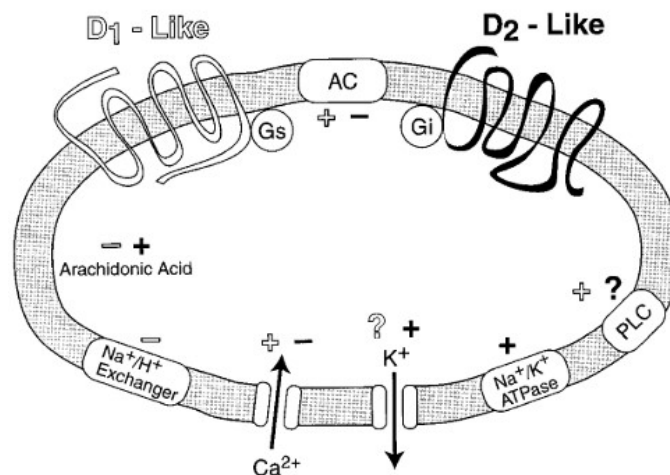


Figure 13 : Exemples de voies de signalisation régulées par les familles de récepteurs de la dopamine D_1 et D_2 . AC, Adénylate Cyclase ; PLC, phospholipase C (d'après Missale et al., 1998)

Pour la famille D_2 , les récepteurs sont essentiellement couplés à une protéine G_i qui est inhibitrice de l'AC, mais ils peuvent également se lier à protéine G_o . Cette famille de récepteurs D_2 serait également impliquée dans l'activation d'autres voies de signalisation indépendantes de l'AMPc comme la régulation de l'activité de certains canaux calciques et potassiques (Lledo et al., 1990; Missale et al., 1998; Callier et al., 2003). Par exemple, cette famille de récepteur serait impliquée dans l'inhibition de canaux calciques diminuant la concentration de calcium intracellulaire (Missale et al., 1998; Callier et al., 2003). A l'opposé, il y aurait une stimulation des canaux potassiques permettant de faire diminuer la concentration intracellulaire de potassium entrainant l'hyperpolarisation membranaire. A terme, cette hyperpolarisation permettra d'inhiber la libération de DA par les neurones présynaptiques et l'inhibition de la libération de prolactine dans l'hypophyse (Lledo et al., 1990; Missale et al., 1998). De plus, le récepteur D_2 activerait le transporteur à protons Na^+/H^+ acidifiant le milieu extracellulaire.

ETAT DE L'ART

Enfin, les récepteurs D₂ et D₄ potentialiseraient la libération de l'acide arachidonique induite par le Ca²⁺ en inhibant l'activité de la PKC (Missale et al., 1998). Ces auteurs rapportent que lorsque les récepteurs D₁ et D₂ sont exprimés de façon simultanée dans une cellule, ils seraient capables d'avoir un effet potentialisateur plus important sur la libération de l'acide arachidonique que les récepteurs D₂ seuls (Missale et al., 1998).

2.2.4.4.2. Dans la reproduction des téléostéens

L'effet inhibiteur de la DA sur les mécanismes physiologiques de la reproduction est issu de l'aire pré-optique au niveau du noyau pré-optique antéro-ventral (NPOav) (Kah et al., 1984) et agit:

- Au niveau de l'aire préoptique au travers des récepteurs de la famille D₁ et D₂ pour inhiber le système à GnRH (Yu et al., 1991; Yu et Peter, 1992; Bryant et al., 2016)

En plus de l'étude de Yu et Peter sur la libération de la GnRH, une autre équipe a suggéré que les récepteurs de la famille D₁ seraient impliqués dans la reproduction des téléostéens. Ils ont montré que l'injection d'un agoniste des récepteurs D₁ chez le poisson rouge diminuait la libération de LH d'environ 50% mais également les niveaux d'expression de l'aromatase B dans l'hypothalamus (Popesku et al., 2010, 2012).

- directement au niveau de l'hypophyse :
 - pour inhiber la libération de LH au travers des récepteurs de la famille D₂ (Kah et al., 1984, 1987; Omeljaniuk et al., 1987; Chang et al., 1990)
 - pour diminuer l'expression de l'ARNm des récepteurs de GnRH par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₂ (Levavi-Sivan et al., 2004)
 - pour diminuer le nombre de cellules gonadotropes (Osornio et al., 2004)
 - pour inhiber la libération de GnRH des terminaisons axonales au travers des récepteurs de la famille D₂ (Yu et al., 1991; Yu et Peter, 1992)

Pour effectuer cette inhibition hypophysaire, la DA par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₂ agit directement au niveau de certaines voies de signalisation notamment celles

ETAT DE L'ART

induites par les molécules de GnRH (cf *partie 2.2.3.1.*) dans les cellules gonadotropes pour diminuer la libération basale ou induite de LH (Chang et al., 2000; Figure 14). Par exemple, la DA peut inhiber :

- l'activité des canaux calciques qui permettent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule (Van Goor et al., 1998),
- l'activité de la PLC pour atténuer l'augmentation d'Inositol trisphosphate (InsP) et de Ca^{2+} intracellulaire induits par la GnRH,
- l'activité de la PKC et
- la formation d'AMPc

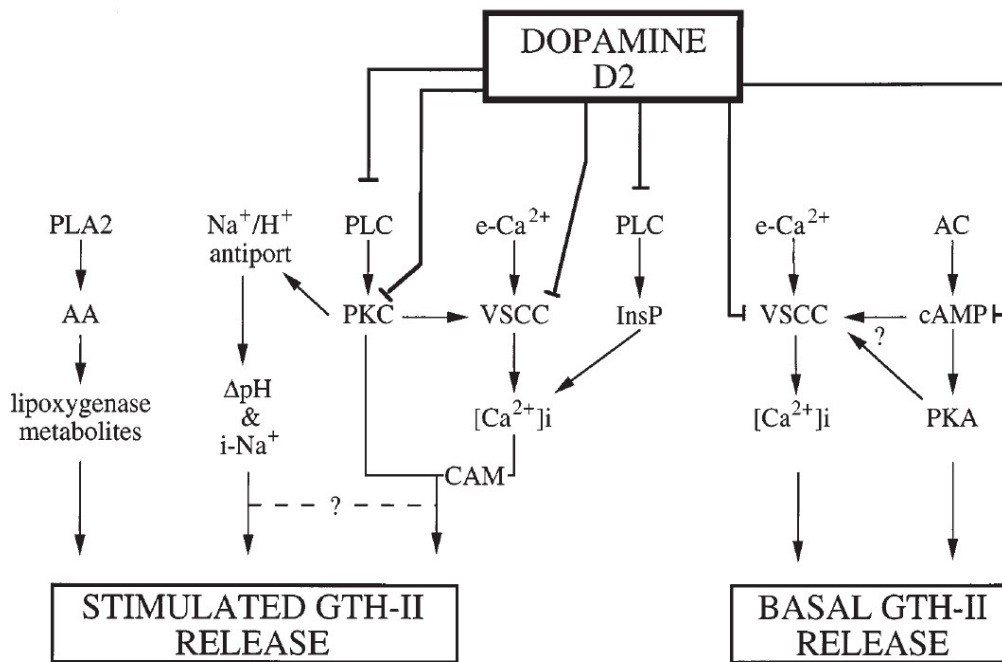


Figure 14 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation régulées par l'inhibition dopaminergique au travers des récepteurs D_2 sur la libération basale de LH ou après la stimulation par une molécule de GnRH dans les cellules gonadotropes du poisson rouge, *Carassius auratus*. AA, Acide arachidonique ; AC, Adénylate Cyclase ; CAM, Calmodulines ; cAMP, cyclic Adenosine MonoPhosphate ; GTH-II, Gonadotropin hormone II (LH) ; InsP, Inositol trisphosphate ; PKA, Protéine Kinase A ; PKC, Protéine Kinase C ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; PLC, Phospholipase C ; VSCC, Voltage Sensitive Calcium Channels (d'après Chang et al., 2000).

ETAT DE L'ART

De plus, la DA interagit également avec différentes molécules au niveau cérébral. Par exemple, des études ont suggéré que la DA inhiberait la synthèse de GABA, stimulateur de la LH, et plus exactement de l'enzyme de synthèse de GABA, la glutamate décarboxylase 67, GAD67 (Hibbert et al., 2004, 2005; Martyniuk et al., 2007). Enfin, l'hypothèse d'une interaction entre la mélatonine et le système dopaminergique a été émise. Par l'intermédiaire de la DA, la mélatonine régulerait de façon positive ou négative la reproduction et notamment l'axe gonadotrope chez certaines espèces de téléostéens. Cette interaction mélatonine-DA permettrait peut-être de faire le lien entre les stimuli environnementaux et l'axe gonadotrope (Chaube et Joy, 2002; Sébert et al., 2008a; Dufour et al., 2010; Migaud et al., 2010).

2.2.4.5. La dopamine au cours du cycle de reproduction

L'activité dopaminergique varie au cours du cycle (Levavi-Sivan et al., 2010). Précédemment, nous avons vu que les stéroïdes sexuels effectuent des rétrocontrôles positifs et négatifs aux différents niveaux de l'axe gonadotrope. La DA va être la cible de ces rétrocontrôles, notamment par l'E₂ (Linard et al., 1996). Une équipe a d'ailleurs montré que l'E₂ régule positivement les niveaux des récepteur D₂ de la DA chez un hybride de tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Levavi-Sivan et al., 2003). Au cours de la vitellogenèse, l'inhibition dopaminergique de la LH serait stimulée par les niveaux élevés d'E₂ et serait maximale à la fin de la gamétogénèse (Vacher et al., 2000, 2002; Dufour et al., 2005, 2010). La diminution de cette inhibition dopaminergique durant l'induction de l'ovulation dépendrait des niveaux d'E₂ qui chutent et probablement des signaux internes et environnementaux perçus (Dufour et al., 2005).

Lorsque les conditions environnementales sont inappropriées, par exemple en conditions captives, la maturation méiotique ovocytaire peut être arrêtée et les ovocytes pourront devenir atrétiques (Mañanós et al., 2008). A ce stade, cette inhibition dopaminergique apparaît alors comme importante chez certaines espèces en élevage (Dufour et al., 2005). Nous verrons dans la partie III quelles solutions peuvent être apportées.

2.3. La régulation des phases finales de la reproduction

2.3.1. La maturation méiotique ovocytaire

La LH joue un rôle important dans le processus de maturation méiotique ovocytaire (Kagawa et al., 1998; Planas et al., 2000; Patino et Sullivan, 2002; Zarski et al., 2015). La LH

ETAT DE L'ART

aurait deux effets sur le follicule ovarien. Un premier effet permettant au follicule et à l'ovocyte d'acquérir la compétence à subir la maturation, c'est-à-dire à ce que les cellules folliculaires soient capables de produire le MIS et que l'ovocyte soit capable d'y répondre. Le deuxième effet serait le phénomène de maturation ovocytaire proprement dit, la production du MIS et la reprise de la méiose ovocytaire (Patino et al., 2001; Lubzens et al., 2010).

2.3.1.1. L'acquisition de la compétence folliculaire et ovocytaire

Dans le but d'acquérir cette compétence, la LH, par action sur ses récepteurs folliculaires, entraînerait la synthèse *de novo* de nouvelles molécules (ARN et protéines) par l'ovocyte (Patino et al., 2001). Parmi ces molécules, nous pouvons retrouver la 20 β -HSD, les récepteurs MIS qui permettent de sensibiliser l'ovocyte au MIS ainsi que les connexines, constituants majeurs des jonctions intercellulaires GAP (Patino et al., 2001; Thomas et al., 2001; Lubzens et al., 2010).

Les facteurs de croissance tels que les IGFs et les activines, membre des TGF β , *Transforming Growth Factor β* , pourraient réguler l'acquisition de la compétence « maturationnelle » (Patino et al., 2001; Pang et Ge, 2002; Patino et Sullivan, 2002). Parmi les TGF β , BMP 15, *Bone Morphogenetic Protein 15* et Tgfb1 seraient également impliqués mais comme inhibiteurs (Clelland et Peng, 2009; Lubzens et al., 2010).

En 2009, Tan et son équipe ont suggéré que ces effets pourraient passer par la régulation de l'expression des récepteurs au MIS, les mPRs (Tan et al., 2009).

2.3.1.2. Le phénomène de maturation proprement dit

Suite à l'acquisition de cette compétence, la LH peut déclencher la maturation ovocytaire proprement dite et il s'opère un changement de direction dans la synthèse des stéroïdes encore appelé « shift » stéroïdien. Il se produit alors une diminution de la production d'E₂ et une augmentation de la production du MIS par les cellules de la granulosa (Nagahama et Yamashita, 2008). Ce shift serait indispensable pour le déclenchement de la maturation méiotique ovocytaire avec la reprise de la méiose (Yaron et Levavi-Sivan, 2011). En effet, comme nous l'avons vu précédemment (cf. *partie 2.2.1.2.*), la maturation méiotique ovocytaire est induite par le MPF qui est produit lorsque la concentration intracellulaire d'AMPc chute en raison d'une diminution de l'activité de la PKA. Or, toute inhibition de cette diminution d'activité de la PKA pourrait empêcher le déclenchement de la maturation (Haider et Baqri,

ETAT DE L'ART

2000). Pang et son équipe ont émis l'hypothèse que lors de la phase de vitellogenèse, lorsque les taux d'E₂ sont élevés, cette dernière se fixe sur son récepteur GPR30, stimule l'activité PKA et de ce fait empêche la maturation méiotique ovocytaire (Pang et al., 2008). Lors du shift stéroïdien, la production d'E₂ est remplacée par la production de MIS, diminuant l'implication de la voie GPR30, augmentant la voie du récepteur MIS et déclenchant ainsi la maturation (Pang et al., 2008; Clelland et Peng, 2009).

Deux hypothèses pourraient expliquer ce changement de direction dans la synthèse des stéroïdes.

Tout d'abord, ce shift pourrait être dû à l'enzyme Cyp17a (P450c17) qui est responsable de la conversion de la prégnénolone en déhydroépiandrostérone et de la progestérone en androsténédione (précurseurs de l'E₂) par l'intermédiaire de ses deux activités enzymatiques, la 17 α -hydroxylase et la 17,20-lyase (Nagahama et Yamashita, 2008; Figure 15). L'activité 17 α -hydroxylase (1) convertit la prégnénolone en 17 α -hydroxyprégnénolone et la progestérone en 17 α -hydroxyprogestérone (précurseur de la DHP) tandis que l'activité 17,20-lyase (2) de la Cyp17a1 convertit la 17 α -hydroxyprégnénolone en déhydroépiandrostérone et la 17 α -hydroxyprogestérone en androsténédione (précurseur de l'E₂). Chez certains téléostéens, cette

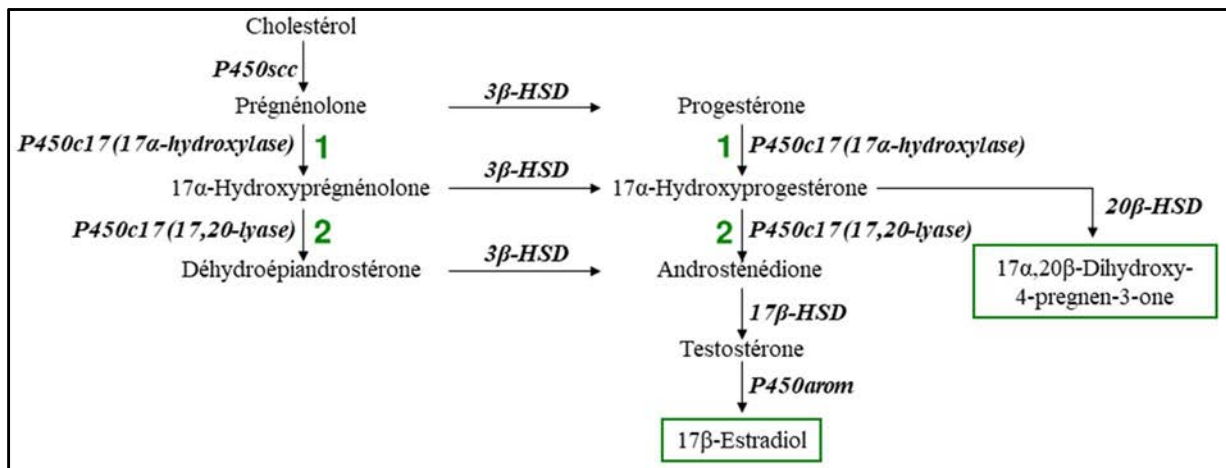


Figure 15 : Voies de biosynthèse des stéroïdes sexuels impliqués dans la production de la 17 β -Estradiol (vitellogenèse) et la 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation méiotique ovocytaire) dans les ovaires de téléostéens. P450_{scc}, P450 side-chain cleavage ; P450c17, Cytochrome P450c17 avec une activité 17 α -hydroxylase (1) et une activité 17,20-lyase (2) ; 3 β -HSD, 3 β hydroxysteroid deshydrogenase ; 17 β -HSD, 17 β hydroxysteroid deshydrogenase ; 20 β -HSD, 20 β hydroxysteroid deshydrogenase ; P450_{arom}, P450 aromatase (modifiée d'après Nagahama et Yamashita, 2008).

ETAT DE L'ART

enzyme existerait sous deux formes dans le follicule, la Cyp17a1 (P450c17-I) avec les deux activités enzymatiques et la Cyp17a2 (P450c17-II) qui ne possède pas d'activité lyase. Les deux formes seraient exprimées à différents moment du cycle. La Cyp17a1 (P450c17-I) serait fortement exprimée pendant la vitellogenèse pour produire l'E₂ alors qu'au moment de la vitellogenèse tardive et de la maturation, son expression diminuerait pour laisser la place à la Cyp17a2 (P450c17-II) permettant la production de la DHP (Zhou et al., 2007a, b).

D'un autre côté, ce shift pourrait également être dû à l'enzyme 20 β -HSD qui convertit la 17 α -hydroxyprogestérone en DHP. Bien que ce ne soit pas le cas chez toutes les espèces étudiées, l'activité et l'expression de cette enzyme seraient régulées positivement avec ou sans stimulation par l'hCG ou *human Chorionic Gonadotropin*, lors de la maturation méiotique ovocytaire comme par exemple chez le tilapia du Nil, l'ayu, *Plecoglossus altivelis*, ou encore la truite arc-en-ciel (Senthilkumaran et al., 2002; Tanaka et al., 2002; Nakamura et al., 2005). Cette enzyme est non seulement exprimée au niveau des ovaires et des testicules, mais également au niveau du cerveau, des reins et des branchies (Guan et al., 1999; Senthilkumaran et al., 2002; Wang et Ge, 2002). Ainsi, le MIS pourrait directement réguler la reproduction au niveau du cerveau mais également agir en tant que phéromone lors de la reproduction (Stacey et al., 2003).

Ce changement de direction dans la synthèse des stéroïdes serait également accompagné par une diminution de l'expression de la P450 aromatasase qui serait sous le contrôle de la LH, et une augmentation de l'expression de la StAR et de la P450scc (Nagahama et Yamashita, 2008).

Enfin, cette phase de maturation serait régulée par de nombreux facteurs tels que les IGFs, l'activine, les EGF, *Epidermal Growth Factor*, TGF α et β et le BMP15 (Patino et Sullivan, 2002; Clelland et Peng, 2009).

2.3.2. L'ovulation

Si la régulation du mécanisme de maturation méiotique ovocytaire devient de plus en plus claire au fil du temps, il n'en est pas de même pour la régulation de l'ovulation. Certaines études pensent que la LH exerce son action de façon indirecte sur l'ovulation. En effet, après la stimulation par la LH, le MIS irait se fixer sur son récepteur nucléaire, déclenchant peut-être

ETAT DE L'ART

la production de prostaglandines et l'ovulation (Goetz et Theofan, 1979; Pinter et Thomas, 1999; Nagahama et Yamashita, 2008).

D'autres acteurs moléculaires seraient impliqués dans le phénomène d'ovulation. Parmi eux, l'expression de certains facteurs pro-inflammatoire, de coagulation, de vasodilatation ou encore des protéases ont montré une régulation positive avant l'ovulation. Par exemple, l'expression de la Sérine protéase 23 et de la protéine ADAM 22 pour *A Disintegrin And Metalloproteinases 22*, augmente en période pré-ovulatoire (Bobe et al., 2006). Chez le médaka, Ogiwara et son équipe montrent que la Gélatinase A et les Métalloprotéinases 1 et 2 seraient responsables de la rupture folliculaire (Ogiwara et al., 2005). Enfin le phénomène d'hydratation pré-ovulatoire pourraient aussi contribuer à l'induction de l'ovulation (Milla et al., 2006). Toutefois, ces mécanismes restent à être confirmés chez le sandre.

En aquaculture, il est important de comprendre le cycle de reproduction notamment afin de pouvoir le contrôler. Dans la partie précédente, nous avons rappelé le déroulement du cycle de reproduction, sa régulation hormonale et certains mécanismes moléculaires caractérisant les phases finales de l'ovogénèse. Désormais, nous allons faire un état des lieux des différents moyens mis en place pour le contrôler.

3. Les différents moyens de contrôle de la reproduction

Chez les femelles de téléostéens, le moindre dysfonctionnement au cours du cycle de reproduction, de l'initiation de la gamétogénèse jusqu'à la ponte, pourrait entraîner l'échec de la reproduction, c'est-à-dire l'échec de la libération de gamètes viables (Mañanós et al., 2008). En conditions captives, il existe trois principaux dysfonctionnements responsables de cet échec. Le plus couramment observé est l'inhibition de l'étape de maturation méiotique ovocytaire qui conduit à une atrésie de l'ovocyte. (Mañanós et al., 2008; Mylonas et al., 2010). Comme nous l'avons déjà présenté, l'absence de stimuli environnementaux appropriés au niveau cérébral peut être responsable de cette inhibition en empêchant la libération d'hormones hypophysaires notamment la LH (Mylonas et al., 2010). Ainsi dans cette dernière partie, nous allons discuter des moyens de palier à cette inhibition de la libération de la LH afin d'induire l'ovulation.

ETAT DE L'ART

3.1. Le contrôle des paramètres environnementaux en conditions captives

Comme nous l'avons énoncé dans la première partie de cette synthèse, les paramètres environnementaux sont des éléments essentiels pour la reproduction du sandre comme chez beaucoup d'espèces de téléostéens. Tout changement de cet environnement peut représenter un frein à sa reproduction (Zohar et al., 2010). Chez les percidés, la manipulation des paramètres environnementaux tels que la température et/ou la photopériode, est suffisante pour induire la reproduction en conditions captives (Migaud et al., 2002; Müller-Belecke et Zienert, 2008; Zakes et Demska-Zakes, 2009; Sarameh et al., 2012; Fontaine et al., 2015; Khendek et al., 2018). Les variations de température et de photopériode jouaient un rôle crucial sur la reproduction de la perche européenne mais également des autres percidés (Migaud, 2002; Wang et al., 2010). En effet, par l'application d'un programme photo-thermique adapté, plusieurs équipes ont réussi à obtenir des pontes hors-saison chez le sandre (Zakes et Szczepkowski, 2004; Ronyai, 2007; Müller-Belecke et Zienert, 2008; Zakes et Demska-Zakes, 2009). Par exemple, Müller-Belecke et Zienert (2008) ont réussi à avancer et à retarder d'environ deux mois la reproduction par rapport à la saison naturelle. Toutefois, tandis que l'avancée de la reproduction a permis d'obtenir 65% d'œufs en développement, aucun œuf ne s'est développé en la retardant. Afin d'accomplir complètement la maturation méiotique ovocytaire et l'ovulation en dehors de leur période de reproduction, un traitement hormonal a souvent été appliqué en plus du programme photo-thermique (Zakes et Szczepkowski, 2004; Ronyai, 2007; Zakes et Demska-Zakes, 2009).

De façon générale, bien qu'un traitement photo-thermique adéquat semble suffisant pour induire la reproduction du sandre, la détermination du moment exact de son ovulation est difficile voire impossible. Or, en reproduction artificielle, la femelle de sandre libère ses œufs de façon spontanée dans l'eau les rendant inutilisables après quelques minutes, pour une future fécondation *in vitro*, du fait de l'activation de la réaction corticale (Żarski et al., 2012a, b, 2013). De plus, chez les percidés, le développement ovarien des individus d'une même population provenant du milieu sauvage et mis en conditions captives n'est pas totalement synchrone provoquant un allongement de la période de reproduction (Żarski et al., 2012a; Fontaine et al., 2015). En aquaculture, pour assurer une production constante de juvéniles de même taille, plusieurs fois dans l'année (lots de géniteurs différents), mais également réduire les coûts de production en augmentant le niveau de production, l'obtention de façon synchrone d'œufs viables est nécessaire (Żarski et al., 2012a; FAO, 2018b). Dans cet objectif, des

ETAT DE L'ART

traitements hormonaux sont utilisés (Kucharczyk et al., 2007; Zakes et Demska-Zakes, 2009; Żarski et al., 2013, 2015b).

3.2. Les différents traitements hormonaux

Aujourd'hui, de nombreux traitements hormonaux sont utilisés avec succès pour induire et synchroniser la reproduction (maturation méiotique ovocytaire et ovulation) chez différentes espèces de téléostéens. L'application de ces traitements, de plus en plus utilisés en aquaculture, a commencé à la fin des années 30 avec la découverte de la méthode dite « d'hypophysation » bien avant la découverte de la LH.

3.2.1. L'hypophysation et les gonadotropines purifiées de poissons

Cette technique consiste à injecter un homogénat d'hypophyse préparé dans une solution physiologique, prélevée chez un individu (mâle ou femelle) dont les gonades sont très développées à un individu receveur (Fontenele, 1955). Pendant longtemps, cette technique était la seule permettant de stimuler l'ovulation d'individus en captivité (Mañanós et al., 2008). Bien que ces homogénats puissent être obtenus facilement dans les piscicultures, cette technique présente toutefois quelques désavantages. Tout d'abord, c'est une technique qui manque de précision. En effet, ce n'est pas une préparation calibrée et le contenu en molécule active (soit la LH) dans l'hypophyse est inconnu et variable selon le sexe, le poids et l'âge du donneur, la taille de l'hypophyse mais également l'état de maturité du donneur rendant difficile la standardisation de la technique (Marte, 1989; Yaron, 1995). Ensuite, l'homogénat hypophysaire contient des hormones supplémentaires qui peuvent entraîner des effets indésirables chez le receveur (Zohar et Mylonas, 2001). Enfin, cette technique possède un risque fort de transmission de pathogènes (Yaron, 1995). Malgré tout, elle reste encore utilisée aujourd'hui dans certains pays (Mañanós et al., 2008).

Avec le temps, la technique a été quelque peu améliorée et raffinée par l'utilisation d'extraits hypophysaires qui sont des préparations enrichies en hormones hypophysaires de l'homogénat préalablement dosées. Certaines de ces préparations (saumon et carpe) sont disponibles dans le commerce. Cette technique fonctionne sur le même principe que les homogénats et gardent certains inconvénients tels que le risque de transmettre des pathogènes. Par contre, c'est une technique qui est calibrée et a donc permis la mise au point d'un protocole plus standardisé (Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008). Habituellement, cette

ETAT DE L'ART

préparation est administrée en deux doses, une première dose stimulatrice généralement faible (10-20% de la dose totale) et une seconde dose dite de résolution souvent plus importante (80-90% de la dose), injectée 12 à 24h plus tard. Les doses efficaces sont de l'ordre de 2 à 10 mg d'hypophyse / kg du receveur (Zohar et Mylonas, 2001). Chez le sandre, la dose efficace pour induire l'ovulation se situe entre 2,4 à 5 mg/kg et peut se donner en une seule ou deux injections séparées de 12 ou 24h (Steffens et al., 1996; Ronyai, 2007; Zakes et Demska-Zakes, 2009).

Cette technique d'hypophysation reste l'une des plus communément utilisée en aquaculture (Zohar et Mylonas, 2001; Zakes et Demska-Zakes, 2009). Elles ont été appliquées chez plusieurs espèces de poissons et notamment chez le sandre (Drori et al., 1994; Schlumberger et Proteau, 1996; Steffens et al., 1996; Kucharczyk et al., 2007; Ronyai, 2007; Zakes et Demska-Zakes, 2009; Źarski et al., 2013, 2015b).

Compte tenu des inconvénients énoncés plus haut et de l'avancée de la technologie, les hormones hypophysaires de poissons ont ensuite été partiellement ou totalement purifiées. Par comparaison à la technique d'hypophysation, ces molécules purifiées permettent un dosage précis, une répétabilité du traitement et moins de risques de transmission de pathogènes (Mañanós et al., 2008). Toutefois, en plus de la difficulté technique pour isoler ces gonadotropines et le coût élevé, chacune est spécifique de l'espèce et ne peut donc être utilisable que chez des espèces phylogénétiquement proches réduisant leur application possible en aquaculture à une poignée d'espèces (Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008). Dans le commerce, seules les gonadotropines de carpes et de saumons sont disponibles. La difficulté technique et le coût relativement élevé de cette approche ont entraîné l'utilisation d'approches alternatives (Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008).

3.2.2. L'hCG ou *human Chorionic Gonadotropin*

Cette molécule est une gonadotropine humaine purifiée de l'urine de femme enceinte (Katzman et Doisy, 1932). Elle possède une activité LH et FSH bien que cette dernière soit plus faible. Du fait de sa disponibilité, de son faible coût et de son activité standardisée, l'hCG fait partie des gonatropines les plus utilisées en aquaculture pour l'induction de l'ovulation. Comme les méthodes précédentes, cette molécule déclenche une réponse rapide de l'axe gonadotrope en agissant directement au niveau des gonades pour induire la production de stéroïdes et l'induction des phases finales de la gamétogénèse (Zohar et Mylonas, 2001;

ETAT DE L'ART

Mañanós et al., 2008; Zakes et Demska-Zakes, 2009; Mylonas et al., 2010; Żarski et al., 2015b). En effet, l'hCG est un bon inducteur de l'ovulation chez différentes espèces de téléostéens dont le sandre (Lam, 1982; Peter et al., 1988; Marte, 1989; Zakes et Demska-Zakes, 2005; Kucharczyk et al., 2007; Korbuly et al., 2010; Kristan et al., 2013; Żarski et al., 2013, 2015b). La préparation commerciale autorisée contenant l'hCG est le Chorulon™.

En aquaculture, différentes doses d'hCG sont utilisées, de 100 à 4000 UI/kg le plus souvent appliquées en une seule injection ce qui est probablement dû à sa longue demi-vie dans la circulation sanguine (Ohta et Tanaka, 1997; Zohar et Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010). Chez les percidés, Zarski et ses collaborateurs estiment que les doses les plus couramment appliquées se situent entre 400 et 500 UI/kg bien que les doses efficaces se situent entre 200 et 5700 UI/kg (Żarski et al., 2015b). Chez le sandre, les doses les plus efficaces varient de 100 à 700 UI/kg appliquées en une ou deux injections (Zakes et Demska-Zakes, 2009). Toutefois, des auteurs cherchant à déclencher la reproduction du sandre en dehors de leur saison de reproduction en combinant un traitement photopériodique à une, deux ou trois injections d'hCG (doses différentes) ont montré que l'efficacité de l'hCG n'était pas impactée par le nombre de doses injectées. En effet, ni le taux d'ovulation, ni le temps de latence (temps écoulé entre l'injection et l'ovulation), ni le taux de survie des embryons n'ont montré de différence significative selon le nombre de doses appliquées (Zakes et Szczepkowski, 2004). De plus des études ont montré que l'injection d'une seule dose d'hCG à 500 ou 750 UI/kg permettait d'induire 100% d'ovulation chez le sandre (Kristan et al., 2013; Żarski et al., 2013). D'après Kristan et son équipe, ces deux doses seraient celles qui conduisent au meilleur taux d'ovulation par rapport à une dose de 250 ou 1000 UI/kg (Kristan et al., 2013).

Bien que très efficace, cette molécule présente quelques inconvénients. Tout d'abord, cette molécule est une grosse protéine spécifique de l'espèce comme les gonadotropines. Ainsi, lors de son injection chez les téléostéens, cette hormone risque de déclencher une réaction immunitaire (Lam, 1982; Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008). Or, la production d'anticorps pourrait nécessiter une augmentation des doses à administrer ou encore provoquer une inefficacité totale du traitement. En Chine, deux espèces de carpe, la carpe argentée, *Hypophthalmichthys molitrix*, et la carpe à grosse tête, *Hypophthalmichthys nobilis*, dont la reproduction est induite depuis des années par cette hormone, ont développé une résistance

ETAT DE L'ART

immunitaire à celle-ci (Lam, 1982). Cette réponse immunitaire a également été observée chez le bar d'Amérique où il est observé une augmentation dans la circulation sanguine d'anticorps spécifiques à l'hCG (Zohar et Mylonas, 2001). Ensuite, Falahatkar et Poursaeid ont montré que l'induction de l'ovulation par l'hCG induit un stress conduisant à une élévation des concentrations plasmatiques de cortisol chez la femelle de sandre (Falahatkar et Poursaeid, 2014). De plus, cette molécule présente un temps d'action relativement long (temps de latence de 4-5 jours) par rapport à d'autres méthodes d'induction. En effet, une étude a mis en évidence une différence significative entre le temps d'action de l'hCG et celui de la CPH (hypophysation) dont le temps de latence n'était que de 3-4 jours (Żarski et al., 2013). Toutefois, bien que la méthode employée soit différente, une étude semble montrer des temps de latence équivalents entre ces deux traitements (Ronyai, 2007). Enfin, il est intéressant de noter que l'efficacité de l'hCG ainsi que son temps d'action, illustré par le temps de latence, sont étroitement liés au stade de maturation méiotique ovocytaire du sandre (Żarski et al., 2012a, 2013), le temps de latence étant également impacté par la température de l'eau (Żarski et al., 2012a). Or, dans le cadre de la reproduction d'individus issus du milieu sauvage, les femelles d'une même population sont habituellement à des stades de maturation différents à un temps donné (Żarski et al., 2015b).

Enfin, il est intéressant de remarquer que l'hCG est parfois appliquée en parallèle de la méthode d'hypophysation (Kucharczyk et al., 2001; Ronyai, 2007).

Pour finir, il faut savoir qu'il existe également des traitements à base de PMSG pour *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* qui mime également l'effet des molécules FSH et LH. Ces préparations ont été très utilisées pour des usages vétérinaires et cliniques comme l'hCG mais très peu en aquaculture (Mañanós et al., 2008; Zakes et Demska-Zakes, 2009).

3.2.3. La GnRH et les analogues de la GnRH GnRH_a

C'est dans les années 1970 que les molécules de GnRH ont commencé à être étudiées pour induire la reproduction. Bien que les premières études montrent que cette molécule serait efficace pour induire la maturation ovocytaire et l'ovulation, son effet inducteur en application exogène reste controversé. En effet, cette dernière aurait bien un effet sur les niveaux de LH circulants, mais ils seraient trop faibles pour entraîner les phases finales de la gamétogénèse. Sa demi-vie dans la circulation sanguine serait trop courte (environ 5 min) car la GnRH serait

ETAT DE L'ART

rapidement dégradée par des enzymes protéolytiques et ne pourrait donc pas entraîner la reproduction (Donaldson et Hunter, 1983; Zohar et al., 1989, 1990; Goren et al., 1990; Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008).

Au fur et à mesure des années, des analogues de la GnRH ou GnRHa ont été produits. Ces analogues sont des molécules de GnRH qui ont été structurellement modifiées, principalement au niveau des acides aminés 6 et 9 (soumis aux dégradations enzymatiques), mais également au niveau des extrémités N- et C-terminales. Grâce à ces modifications protéiques, les analogues de la GnRH, dont la demi-vie est d'environ 20 min, seraient 30 à 100 fois plus puissants que les molécules de GnRH natives et sont efficaces à des doses de 1 à 100 µg/kg. Ces analogues sont plus résistants aux enzymes protéolytiques et donc peuvent rester plus longtemps dans la circulation sanguine leur permettant, par exemple, de déclencher une libération de LH plus ample et plus longue et ainsi les phases finales. Certains analogues auraient également plus d'affinité pour le récepteur de la GnRH. Parmi tous les agonistes, les molécules les plus utilisées pour induire la reproduction seraient la [D-Ala⁶, Pro⁹, Nethylamide]-mGnRH et la [D-Arg⁶, Pro⁹, Nethylamide]-sGnRH (Zohar et al., 1989, 1990; Goren et al., 1990; Lin et al., 1991; Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008; Mylonas et al., 2010). La sGnRHa serait l'un des analogues les plus efficaces (forte affinité pour les récepteurs hypophysaires et haute résistance à la dégradation ; Yaron, 1995).

Les avantages de ce traitement sont (Mañanós et al., 2008; Mylonas et al., 2010):

- il ne présente pas de risque de développer une réponse immunitaire (petite taille),
- il agit au plus haut niveau de l'axe gonadotrope permettant la libération de la LH endogène et autres hormones hypophysaires,
- il ne possède pas le risque de transmettre des maladies (synthèse d'une forme pure),
- il peut être utilisé sous la même forme chez beaucoup d'espèces de poisson (forte conservation du décapeptide entre les espèces).

Dans la littérature, de nombreuses études ont analysé l'effet de ces traitements hormonaux sur le succès reproducteur (Zohar et Mylonas, 2001; Szabó, 2003; Kristan et al., 2013; Źarski et al., 2015b; Podhorec et al., 2016). Pour donner des exemples, Kristan et son équipe ont étudié l'effet de différentes doses de mGnRHa (1 à 50 µg/kg) sur le déclenchement de l'ovulation et

ETAT DE L'ART

les performances de reproduction chez le sandre. De toutes les doses testées, celle de 25 µg/kg est la seule à induire 100% d'ovulation avec un taux d'éclosion similaire aux plus faibles doses (Kristan et al., 2013). Toutefois, chez la perche européenne, une équipe a montré que la dose de 25 µg/kg de mGnRHa n'induit que 27.6% d'ovulation et que la plus forte dose testée (125 µg/kg) en induit 78% suggérant qu'une forte dose serait nécessaire (Kouril et al., 1997). Chez cette même espèce, une dose de 40 µg/kg a pourtant été montrée suffisante pour induire 100% d'ovulation (Ronyai et Lengyel, 2010). En 2016, une autre équipe avait déjà démontré l'effet bénéfique de ce traitement à cette même dose (25 µg/kg) sur l'induction de l'ovulation mais également sur les taux de LH circulants chez la tanche, *Tinca tinca* (Podhorec et al., 2016). Cependant, Szabó et son équipe démontrent que ni l'analogue de la mGnRH, ni celui de la sGnRH n'entraînent d'ovulation chez le brochet, *Esox lucius* (Szabó, 2003). Ainsi, l'efficacité de ce traitement serait dépendante de l'espèce étudiée même au sein des percidés. En 2015, Zarski et ses collaborateurs suggèrent que ces différences dans l'efficacité de la méthode seraient dues aux stades de maturation variables mais également à l'activité de l'analogue de la GnRH qui varierait suivant la séquence d'acides aminés utilisée (Żarski et al., 2015b).

Malgré tout, des études suggèrent que par rapport à la GnRHa, le meilleur traitement pour induire l'ovulation du sandre reste l'hCG notamment du fait de son action directe au niveau des gonades mais également de sa longue demi-vie (Zakes et Demska-Zakes, 2009; Żarski et al., 2015a). De plus, une étude montre que la GnRHa non seulement est légèrement moins efficace dans l'induction de l'ovulation par rapport à l'hCG (81 vs 89% en moyenne), mais il entraîne des taux d'éclosions moindres (environ 51%) que ceux obtenus avec l'hCG (environ 74%) toutes doses confondues. Cette dernière observation est également confortée si on considère les meilleures doses de chaque traitement, 86% (hCG à 500 et 750 UI/kg) contre 61% (mGnRHa 25 µg/kg; Kristan et al., 2013).

Aujourd'hui, nous savons que les différents traitements testés (hCG, hypophysation, GnRHa) peuvent induire l'ovulation. Toutefois, celle-ci est induite de façon plus ou moins efficace en fonction de la préparation hormonale utilisée. En effet, l'hCG à 500 UI/kg peut provoquer 100% d'ovulation avec un taux d'éclosion autour de 79% (Żarski et al., 2013) et 85% (Kristan et al., 2013) et un taux de survie embryonnaire d'environ 84% (Żarski et al., 2013). Par rapport à la méthode d'hypophysation (67% d'ovulation, 75% de survie et 62% d'éclosion) et à la mGnRHa 25 µg/kg (100% d'ovulation et 61% d'éclosion), le traitement par

ETAT DE L'ART

l'hCG semble donc une solution intéressante pour déclencher l'ovulation chez la femelle de sandre (Kristan et al., 2013; Źarski et al., 2013, 2015a). Cependant, par rapport aux autres traitements, ce traitement n'est pas non plus parfait. En plus des inconvénients énoncés précédemment, il convient de noter que son temps d'action et surtout son efficacité sont strictement dépendants du stade de maturation de la femelle. En effet, l'injection aux stades I et II de maturation affecterait le taux de survie embryonnaire par rapport aux stades les plus avancés (Źarski et al., 2012a, 2015a) Dans un contexte d'optimisation du contrôle de la reproduction du sandre, afin de synchroniser les pontes tout en obtenant des juvéniles viables, d'autres protocoles de traitements hormonaux restent à être étudiés et développés (Źarski et al., 2015a).

3.3. La dopamine et les antagonistes des récepteurs de la dopamine

3.3.1. La GnRH associée à un antagoniste des récepteurs de la dopamine

Depuis quelques temps, des traitements associant des analogues de la GnRH et des antagonistes des récepteurs D₂ de la DA tels que la MCP, la DOM ou le PIM, qui constituent la méthode LinPe (de Lin HR et Peter R ; Peter et al., 1988), sont de plus en plus étudiés (Zohar et Mylonas, 2001; Mañanós et al., 2008; Mylonas et al., 2010; Źarski et al., 2015b). Différentes préparations commerciales combinant les deux molécules sont actuellement disponibles. Par exemple, nous pouvons trouver l'Ovopel (18-20 µg de mGnRHa + 8-10 mg de MCP) et l'Ovaprim (20 µg de sGnRHa + 10 mg de DOM; Źarski et al., 2009; Cejko et al., 2012).

L'objectif de ces associations est de contrecarrer l'effet inhibiteur de la dopamine sur l'axe gonadotrope et permettre un accroissement de la réponse à la GnRH (Mylonas et al., 2010). Ces traitements sont notamment très utilisés chez des espèces présentant une forte inhibition dopaminergique (Peter et al., 1988; Marte, 1989; Yaron, 1995; Zohar et Mylonas, 2001; Kucharczyk et al., 2008; Mylonas et al., 2010; Shourbela et al., 2014). En 2005, une étude a montré que l'association de la GnRHa avec la DOM ou la MCP avait plus d'efficacité pour induire l'ovulation par rapport à la GnRH seule chez le mulot cabot (Aizen et al., 2005). Cet effet a été confirmé par deux études chez le poisson-chat nord-africain, *Clarias gariepinus*, qui montrent que l'addition de PIM ou de DOM à la GnRHa permet d'améliorer l'induction de la reproduction chez cette espèce (Sharaf, 2012; Shourbela et al., 2014). Toutefois, ces résultats sont contredits par l'étude de Guzman et ses collaborateurs chez la sole sénégalaise, *Solea senegalensis*. Ils démontrent que le PIM, seul ou en combinaison avec la GnRHa, n'affecte ni

ETAT DE L'ART

la production d'œufs ni les niveaux d'expression hypophysaires de LH et FSH ni les niveaux plasmatiques de stéroïdes sexuels ou de Vitellogénine (Guzman et al., 2011). Par ailleurs, en 2014, une autre équipe a étudié l'effet de l'Ovaprim, par des analyses *in vivo* et *in vitro*, sur la Vasotocine, les profils des hormones stéroïdes et le pourcentage d'induction de la maturation méiotique ovocytaire (stade GVBD) chez le poisson chat, *Heteropneustes fossilis*. Au cours de leur étude, ils ont montré que l'Ovaprim aurait le potentiel de stimuler l'induction des phases finales et de l'ovulation et ceci via la Vasotocine sans passer par le pulse hypophysaire de LH (Chaube et al., 2014).

Chez le sandre, Zakes et Demska-Zakes ont montré que l'Ovopel est inefficace pour induire l'ovulation et aurait un impact négatif sur sa reproduction. En effet, ils observent que le taux de survie embryonnaire a diminué dans le groupe ayant pondu (taux d'ovulation équivalent au témoin) et que le taux de mortalité des femelles est plus élevé (Zakes et Demska-Zakes, 2005). Toutefois, d'autres études ont montré que l'Ovopel peut induire l'ovulation chez le sandre et d'autres percidés (Kucharczyk et al., 2001; Ronyai, 2007; Ronyai et Lengyel, 2010; Żarski et al., 2013). Une telle différence pourrait s'expliquer, par exemple, par l'utilisation de doses différentes, d'un nombre différent d'injections ou peut être par l'utilisation de stades différents. D'un autre côté, deux de ces études chez la perche européenne et le sandre ont montré que l'effet de l'Ovopel sur l'induction de l'ovulation ne serait dû qu'à la seule action de la GnRHa, l'antagoniste ne permettrait pas d'améliorer l'effet de la GnRH, suggérant que la DA ne serait pas ou peu impliquée chez ces espèces (Ronyai, 2007; Ronyai et Lengyel, 2010). Cependant, ces études ne se sont intéressées qu'aux performances zootechniques de la reproduction et souffrent d'un nombre d'individus faible. La bonne connaissance de l'implication de cette inhibition dopaminergique nécessite une étude complète allant de la zootechnie à l'endocrinologie de la reproduction.

3.3.2. Les antagonistes des récepteurs de la dopamine seuls

Ces dernières années, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à l'effet des antagonistes des récepteurs de la DA utilisés seuls comme activateurs de l'axe gonadotrope et/ou de l'induction des phases finales de la gamétogénèse chez la sole sénégalaise (Guzman et al., 2011), la tanche (Podhorec et al., 2012, 2016), le carassin, *Carassius carassius* (Cejko et Kucharczyk, 2015) ou encore certains percidés tels que la perche européenne (Ronyai et Lengyel, 2010). Ces études montrent une efficacité très variable de ces molécules sur la

ETAT DE L'ART

reproduction suivant l'espèce. En effet, ces études montrent que les antagonistes des récepteurs de la DA appliqués seuls peuvent augmenter les taux d'ovulation et d'éclosion par rapport à sa combinaison avec la GnRH α chez le carassin (MCP; Cejko et Kucharczyk, 2015) et augmenter la libération de LH par l'hypophyse sans induire l'ovulation chez la tanche (MCP; Podhorec et al., 2012, 2016). Toutefois, ces antagonistes appliqués seuls n'ont aucun effet sur l'axe reproducteur (contenu hypophysaire en GnRH, niveaux de transcrits de FSH et LH et taux plasmatiques de stéroïdes) et les phases finales de la reproduction chez la sole sénégalaise (PIM; Guzman et al., 2011) ou chez le poisson chat nord-africain (PIM; Sharaf, 2012). Toutefois, pour cette dernière étude, le PIM seule diminue les concentrations plasmatiques de T de la même façon qu'avec les autres traitements étudiés (GnRH+PIM, GnRH α seule et l'Ovaprim) par rapport au contrôle. Chez la perche européenne, Ronyai et Lengyel ont montré que la MCP seule est inefficace pour induire l'ovulation (Ronyai et Lengyel, 2010). A notre connaissance, chez le sandre, aucune étude ne s'est intéressée à l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de la DA seuls sur le succès reproducteur et la physiologie des géniteurs femelles lors des phases finales de l'ovogenèse.

**PROBLEMATIQUES &
OBJECTIFS**

PROBLEMATIQUES & OBJECTIFS

Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement d'une pisciculture durable par la production de nouvelles espèces d'intérêt aquacole comme le sandre, *Sander lucioperca*. Le développement et la pérennisation de cette production aquacole nécessitent la compréhension et la maîtrise de la reproduction afin d'obtenir des œufs et des juvéniles viables de manière synchrone et prévisible en s'appuyant sur plusieurs cycles de reproduction par an (pontes hors-saisons).

Aujourd'hui, nous savons que le cycle de reproduction et notamment l'induction des phases finales de l'ovogenèse est un processus très complexe qui est soumis à une régulation très fine au travers de l'axe gonadotrope par des facteurs neuroendocriniens mais également environnementaux. Le moindre dysfonctionnement dans cette régulation coordonnée peut provoquer l'échec de la reproduction avec l'absence d'ovulation. La captivité (stress ou absence de signaux environnementaux appropriés) peut être un élément déclencheur de ces dysfonctionnements reproducteurs qui peuvent être extrêmement variables selon les espèces de téléostéens.

Chez le sandre, des études ont montré que l'application de traitements photo-thermiques adéquats est suffisante pour induire la reproduction. Toutefois, l'application de traitements hormonaux reste nécessaire pour anticiper et synchroniser les pontes et obtenir des œufs et des larves de qualité. Aujourd'hui, nous savons que les traitements hormonaux à base de gonadotropines, de GnRHa et même d'antagonistes des récepteurs D₂ de la DA associés à la GnRHa peuvent être efficaces notamment chez le sandre. Toutefois, aucun traitement n'est apparu suffisamment satisfaisant chez le sandre, chacun possédant ses avantages et ses inconvénients. De plus, les traitements associant un analogue de la GnRH à un antagoniste des récepteurs de la famille D₂ ont également montré des effets contradictoires sur l'induction des phases finales nous amenant à nous interroger sur le rôle exact du blocage des récepteurs D₂ dans cette association. Par ailleurs, de rares études ont suggéré que les récepteurs de la famille D₁ de la DA pourraient être impliqués dans la reproduction des téléostéens. Chez le sandre, non seulement aucune étude n'a investigué l'implication de ces récepteurs dans sa reproduction mais aucune information n'est disponible d'une manière générale sur les récepteurs de la DA existant chez cette espèce. Finalement, l'essentiel des études qui ont été menées chez le sandre sur le rôle des traitements anti-dopaminergiques ne se sont intéressées qu'aux aspects

PROBLEMATIQUES & OBJECTIFS

zootechniques de la reproduction sans porter attention à la dimension physiologique (ex : effets sur l'axe gonadotrope).

A la lumière de cette problématique et dans le but d'optimiser la reproduction du sandre, je me suis intéressée à l'implication des récepteurs de la DA notamment dans l'induction des phases finales mais également dans la régulation de l'axe gonadotrope.

Dans cet objectif, mon projet de thèse se divise en trois chapitres :

Un premier chapitre au cours duquel nous étudierons *in vivo* les effets, sur la régulation de l'axe gonadotrope et les performances de reproduction, d'un blocage des deux familles de récepteurs de la DA, D₁ et D₂ et ceci en l'absence puis en présence d'une stimulation de l'axe gonadotrope par une molécule de sGnRHa.

Ce chapitre I sera présenté sous la forme d'un article publié dans la revue *animal* et intitulé : *D1, but not D2, dopamine receptor regulates steroid levels during the final stages of pikeperch gametogenesis.*

Un deuxième chapitre au cours duquel nous chercherons à établir le répertoire et le profil d'expression des récepteurs de la DA à partir de l'analyse du transcriptome cérébral de sandre au cours de la maturation méiotique ovocytaire.

Ce chapitre II sera présenté sous la forme d'un article en préparation pour être soumis dans la revue *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* et intitulé : *First characterization and distribution of dopamine receptors in pikeperch during the pre-ovulatory period.*

Un troisième chapitre au cours duquel nous chercherons à déterminer de manière *in vitro* si la DA et/ou l'une de ses familles de récepteurs sont impliqués dans la régulation directe et locale de l'axe gonadotrope aux niveaux cérébral et ovarien.

Ce chapitre III sera présenté sous la forme d'un article en préparation et intitulé: *Both D₁ and D₂ dopamine receptor families are involved in the up-regulation of sex-steroid production from pikeperch ovary during the final oocyte maturation.*

CHAPITRE I

CHAPITRE I

D1, but not D2, dopamine receptor regulates steroid levels during the final stages of pikeperch gametogenesis

J. Roche¹, D. Źarski^{1a}, A. Khendek¹, I. Ben Ammar¹, C. Broquard¹, A. Depp¹, Y. Ledoré¹, T. Policar², P. Fontaine¹ and S. Milla^{1†}

¹UR AFPA, USC INRA 340, Université de Lorraine, Boulevard des Aiguillettes, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ²South Bohemian Research Centre of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia, Zatisi 728/II, 389 25, Vodňany, Czech Republic

(Received 6 September 2017; Accepted 9 March 2018)

In pikeperch, Sander lucioperca, aquaculture hormonal treatment is usually applied to synchronize ovulation. However, the effect of dopamine (DA) receptor antagonists, in particular those blocking the D1 DA receptors, remains unknown. Thus, the aim of the present study was to investigate and compare the effects of D1 and D2 DA receptor antagonists on the sex-steroid production and reproductive performance of the species. Two experiments were performed during which mature pikeperch females were injected with different molecules: NaCl 0.9% (negative control) or human chorionic gonadotropin 500 IU/kg (positive control) in both experiments, metoclopramide (a D2 receptor antagonist; 4 mg/kg or 20 mg/kg) or SCH23390 (a D1 receptor antagonist; 0.8 mg/kg or 4 mg/kg) alone (experiment 1) or in combination with a salmon gonadotropin-releasing hormone analogue (sGnRH_a at 25 µg/kg; experiment 2). In experiment 2, fish were also injected with sGnRH_a (25 µg/kg) as positive control. Samplings of oocytes and blood were performed on the day of injection and after 24 h (both experiments), after 48 h (experiment 2) and at the time of ovulation (both experiments). In non-ovulating fish, samplings were performed 7 days (experiment 1) or 14 days (experiment 2) after injection. In experiment 2, various zootechnical parameters of fertilized eggs were recorded (survival, hatching and malformation rates). The two antagonists alone were ineffective in inducing the final stages and regulating sex-steroid (testosterone, 11 ketotestosterone, 17β estradiol and 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one) production. When administered with sGnRH_a, both SCH23390 and metoclopramide induced the final stages. However, only SCH23390 stimulated testosterone (4 mg/kg) and 17β estradiol (0.8 mg/kg) production compared with sGnRH_a alone. None of the treatments affected the survival, hatching or malformation rates. This is the first report suggesting that in pikeperch the D1, but not the D2, DA receptor antagonist would be involved in the testosterone and 17β estradiol production as a potentiator of the sGnRH_a effect.

Keywords: pikeperch, ovulation, dopamine, antagonist, sex steroid

Implications

This work provides information about the effects of some hormonal treatments on the induction of pikeperch reproduction in order to produce high-quality offspring in a synchronous and predictable way for aquaculture. This work will allow optimizing pikeperch spawning and therefore improving production.

Introduction

Pikeperch, *Sander lucioperca*, is a species of interest for aquaculture diversification. It is a highly valuable economic and commercial species partly thanks to its flesh quality and

recreational value (Kestemont *et al.*, 2015). Despite an increase in inland aquaculture production over the past decades, declining captures remain today the main supply to the increasing market demand (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). Consequently, great efforts are made to develop pikeperch aquaculture in order to respond to consumer demand. To achieve this objective, controlling the production of high-quality offspring in a synchronous and predictable way, year after year, is a crucial step in the culture process (Źarski *et al.*, 2015).

Controlled fish spawning is usually supported by the application of hormonal treatment, which allows synchronizing the ovulation process and optimizing egg collection while minimizing the handling and stress to the fish (Zohar and Mylonas, 2001). In pikeperch, various hormonal treatments have already been tested. The most widely used, human chorionic

^a Present address: Department of Ichthyology, Faculty of Environmental Sciences, University of Warmia and Mazury, ul. Oczapowskiego 2, 10-719, Olsztyn, Poland.

[†] E-mail: sylvain.milla@univ-lorraine.fr

gonadotropin (hCG), was found to be highly effective in triggering ovulation (Zarski *et al.*, 2015). However, the spawning effectiveness observed in this species was highly variable, with frequently reported ovulation rates between 75% and 100% and embryonic survival rates between 50% and 90% (Zarski *et al.*, 2015). Besides, some authors demonstrated that application of hCG induces immune (Zohar and Mylonas, 2001) and stress responses (Falathkar and Poursaeid, 2014), which could alter the subsequent reproductive operations (i.e. need to use higher doses of hCG or ineffectiveness of the treatment) (Zohar and Mylonas, 2001). For these reasons, analogues of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) were applied as an alternative treatment in finfish reproduction (Mylonas *et al.*, 2010; Zarski *et al.*, 2015). Gonadotropin-releasing hormone acts directly at the pituitary level of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis stimulating the release of gonadotropin (LH), sex-steroid secretion and finally progression of the final stages of gametogenesis (oocyte meiotic maturation and ovulation). However, both basal and GnRH-stimulated LH secretion are under dopaminergic inhibition (Yaron and Levavi-Sivan, 2011). Thus, the combination of dopamine (DA) receptor antagonists with GnRH is usually used (Mylonas *et al.*, 2010) partly because antagonists would enhance the reproductive effectiveness of GnRH therapy (Zarski *et al.*, 2015). Usually, the D2 DA receptor antagonists (metoclopramide (MCP), domperidone or pimozide) have been used. The application of D2 DA receptor antagonists alone had positive effects on spawning in crucian carp, *Carassius carassius* (Cejko and Kucharczyk, 2015). By contrast, in Senegalese sole, *Solea senegalensis*, these treatments were found to be ineffective (Guzman *et al.*, 2011). In some perciforms, the effects of these antagonists on the reproductive effectiveness are highly contradictory and reduce the significance of the DA effect in this fish order (Dufour *et al.*, 2010; Zarski *et al.*, 2015). Thus, the effectiveness of DA antagonists seems to be species-specific and its use should be verified for each species separately.

In vertebrates, DA effects are mediated through the binding to two receptor families: D1 and D2 receptor families (Cardinaud *et al.*, 1997; Dufour *et al.*, 2010). Interestingly, unlike D2 receptors, there is a lack of data concerning the existence and the role of D1 receptors in fish reproduction, although they were suggested to be involved in the control of GnRH release (Yu and Peter, 1992; Kapsimali *et al.*, 2000). In addition, *in vivo* studies showed that the DA/D1 receptor complex regulates the decrease in serum LH levels and aromatase B transcript levels in the hypothalamus of the goldfish, *Carassius auratus* (Popescu *et al.*, 2010 and 2012). These data suggest that species specificity of DA may be associated with different involvement of D1 and D2 receptors in the overall DA-related processes. The use of DA antagonists specific to D1 or D2 receptor family alone has never been tested in pikeperch. In addition, the combination of the D1 receptor antagonist with GnRH has never been studied to date. This, together with the unclear role of DA in perciform reproduction (Dufour *et al.*, 2010; Zarski *et al.*, 2015), creates the need for a detailed investigation of this

mechanism which could form the basis for pikeperch-specific hormonal treatment protocols.

Given the lack of data about the effects of DA receptor antagonists alone (D1 and D2) or in combination with GnRH (D1) and the unknown involvement of receptors D1 in pikeperch reproduction, we aimed to investigate the *in vivo* physiological (sex steroid) and zootechnical responses (gonado-somatic index (GSI), progress of the oocyte meiotic maturation, ovulation rate, latency time, survival, hatching and malformation rates) to D1 and D2 DA receptor antagonists in pikeperch.

Material and methods

This study was split into two independent *in vivo* experiments. The first experiment was performed as a preliminary study to describe the effects of two DA antagonists specific to D1 or D2 receptor, SCH23390 (SCH) or MCP, respectively, applied alone on pikeperch reproduction. The second experiment was dedicated to point out the effects of the two antagonists combined with a GnRH on pikeperch reproduction. Both experiments were performed according to the European and French legislation for fish welfare and approved by the institutional Ethics Committee (APA-FIS3073-2016022913149909). Fish were handled after anaesthesia by immersion in a bath containing 150 mg/l of ethyl 3-aminobenzoate (MS-222; Sigma-Aldrich, Lyon, France).

Broodstock management

Experiment 1. On 1 May 2015, 36 mature females (origin: production pond, Fishery Nove Hradý Ltd, Czech Republic; age: 3 to 4 years old; mean BW: 1.07 ± 0.06 kg) were transported to an outdoor recirculating system (La Bouzule, Laneuvelotte, France). On 4 May 2015, all the fish were individually tagged (ID-100A Microtransponder; Dorset Group BV, Aalten, The Netherlands). Fish were maintained in sub-squared tanks (3000 l, 1-m deep), fed to satiation with forage fish and exposed to natural photoperiod (Nancy, France) and temperature conditions (mean temperature: $17.3 \pm 2.7^\circ\text{C}$) throughout the 2 weeks of experiment. Once a week, pH, and ammonia and nitrite concentrations in the water were measured using a WTW 340i pH meter and a CARY I spectrophotometer, respectively. All values remained above 7.5 for pH and below 1 mg/l for nitrites and ammonia.

Experiment 2. On 15 January 2016, 47 mature females reared in captivity (origin: Czech Republic; age: 4 to 5 years old; mean BW: 2.39 ± 0.48 kg) were used in the facilities of the fish farm Asialor (Pierrevillers, France). Tagged fish (FDX-B transponder; Biolog-ID, Bernay, France), were maintained in two 8000 l tanks in a recirculating aquaculture system under 20 lux of light intensity at the water surface. Before the experiment, all fish were subjected to an increase in photoperiod and temperature to reach 14 h light–10 h dark and 12.5°C , respectively. Throughout the experiment, fish were kept under automatically controlled photoperiod (from 14 h

light–10 h dark to 15 h light–9 h dark) and temperature ($12.9 \pm 0.14^\circ\text{C}$) mimicking the environmental conditions prevailing during spawning. Dissolved oxygen (>6 mg/l) and pH (7.8 ± 0.2) were monitored daily. Ammonia and nitrite concentrations in the water were measured using a colourimetric method once a week and remained below 0.5 mg/l.

Evaluation of oocyte maturation stages

For both experiments, each female was catheterized for evaluation of the oocyte maturation stages at different sampling times (as described in the sampling strategy) according to the classification by Zarski *et al.* (2012). In brief, oocytes were sampled using a catheter (CH06; 1.2 mm internal and 2 mm external diameter) and placed in Serra's solution (ethanol/formalin/glacial acetic acid, 6:3:1 v/v/v). After mixing slowly oocytes in Serra's solution and waiting (about 5 min) until the cytoplasm of the oocyte will become clarified, the oocyte maturation stage was evaluated under binocular microscope, magnification 4 \times (Motic[®] SFC-11 Series, Motic Asia, Hong Kong, China). In pikeperch, the final stages of maturation were divided into seven morphological stages, from stage I to stage VII (ovulation; Zarski *et al.*, 2012). This allowed following the progression of the oocyte meiotic maturation (hereinafter termed final oocyte maturation (FOM)) until ovulation.

Hormonal treatments

Experiment 1. On 4 May 2015, oocyte maturation stages were evaluated for each female. Females between stages II and IV were randomized, sampled for blood (0 h) and injected intraperitoneally with one of the following treatments: (1) negative control with saline solution, the vehicle of all molecules (NaCl 0.9%, $n = 5$); (2) positive control with hCG (500 IU/kg, $n = 5$; Sigma-Aldrich); a D2 DA receptor antagonist; (3) MCP 4 (4 mg/kg, $n = 6$; Sigma-Aldrich) or (4) MCP 20 (20 mg/kg, $n = 7$); a D1 DA receptor antagonist, (5) SCH 0.8 (0.8 mg/kg, $n = 6$; Abcam, Paris, France) or (6) SCH 4 (4 mg/kg, $n = 7$). The doses applied for hCG and MCP 20 were the most commonly used in controlled reproduction of percids (Zarski *et al.*, 2015). For SCH, the doses applied were chosen to be consistent with the literature and to get a common dose between MCP and SCH.

Experiment 2. On 15 January 2016, after determination of the oocyte maturation stage, all the females at stage I were randomized and injected intraperitoneally with one of the following treatments: (1) negative control with NaCl (0.9%, $n = 9$); (2) a first positive control with hCG (500 IU/kg, $n = 7$); (3) a second positive control with a salmon-GnRH analogue ((sGnRH_a), 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 7$; Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Arg-Trp-Leu-Pro-NHEt acetate salt; Syndel Laboratories Ltd, Nanaimo, Canada); (4) MCP 4 or (5) MCP 20 in combination with sGnRH_a (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 6$ and $n = 5$, respectively); (6) SCH 0.8 or (7) SCH 4 in combination with sGnRH_a (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 7$ and $n = 6$, respectively). Before injection, 10 females were randomly sampled for blood (0 h). The doses applied in both positive control groups were the most

commonly used in controlled reproduction of percids (Zarski *et al.*, 2015).

Sampling strategy

Experiment 1. Blood and oocytes were sampled 0 and 24 h after injection and at the time of ovulation or 7 days after injection (final sampling time, if the female did not ovulate). Blood was sampled from the caudal vein and placed in tubes containing heparin (28 mg/ml; 100 kU Sigma-Aldrich). Plasma was obtained by centrifugation (15 min at 10 000 r.p.m.) and stored at -80°C until further steroid hormone analysis. At the final sampling time, the fish were killed by overexposure to anaesthetics MS-222 (240 mg/l) and the whole gonads were cut out and weighed.

The following parameters were recorded: the progression of FOM (= number of oocyte meiotic maturation stages between injection and the time of ovulation (or the end of the experiment)); the GSI (= $100 \times$ gonad weight/total fish weight); the ovulation rate for each treatment group (= $100 \times$ number of ovulating females/total number of females); and the latency time (= time interval between injection and ovulation).

Experiment 2. Blood and oocytes were sampled 0, 24 and 48 h after injection and at the time of ovulation or 14 days after injection (final sampling time). Then, plasma was recovered and stored at -80°C until further steroid hormone analysis. From 48 h, if the females did not reach stage VI, oocyte maturation stages were determined every 2 days. At stage VI, the genital papilla was sewn (as described by Zarski *et al.*, 2015) in order to prevent spontaneous releasing of eggs into the tank. From stage VI, ovulation control was performed every 6 h by gentle massage of the abdomen. At the time of ovulation, eggs were collected in dry plastic containers, weighed and then kept tightly covered at 11°C for no longer than 30 min until fertilization.

For *in vitro* fertilization, sperm was collected from 30 males of pikeperch (origin: Czech Republic; age: 4 to 5 years old; mean BW: 2.39 ± 0.36 kg). For each spawn, sperm from three males, injected with hCG (250 IU/kg) at 0 h, was collected in a dry syringe. For each fertilization procedure, only freshly collected sperm (15 min maximum before fertilization), with a motility rate above 80% evaluated under a light microscope (magnification 400 \times ; Motic[®] B3 Series, Motic, Hong Kong, China) (Cejko *et al.*, 2010) was used. For each female, three egg samples (~50 to 100 eggs each) were placed in three glass Petri dishes containing 5 ml of hatchery water. Simultaneously, 50 μl of pooled sperm was added in each dish. After vigorous agitation for 15 s, each dish was incubated in plastic cups containing 500 ml of water at 12°C .

The progression of FOM, the ovulation rate and the latency time were recorded. The GSI was not calculated due to the necessity to keep the fish alive. Additional zootechnical parameters were recorded: the embryo survival rate at 72 h post fertilization (= $100 \times$ number of viable eggs/total number of eggs), the hatching rate (= $100 \times$ number of larvae/total

number of viable eggs) and the malformation rate (= 100 × number of larvae showing malformations (lordosis, cardiac oedema, kyphosis, fragmentation of oil droplet, yolk sac oedema, spinal curvature, scoliosis, C-shaped larvae)/total number of larvae).

Levels of sex-steroid hormones in blood plasma

For both experiments, sex-steroid hormones (17β estradiol (E₂), testosterone (T), 11 ketotestosterone (11KT) and 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)) were measured in plasma using commercially available competitive ELISA kits. The kits for E₂ (KAP0621) and T (KAPD1559) were obtained from Diasource (Louvain-La-Neuve, Belgium), the kit for 11KT (582751) from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) and the kit for DHP (MBS2602842) from MyBiosource (San Diego, CA, USA). The sensitivity limit, and the intra- and interassay CV were, respectively, 0.005 ng/ml (range: 0 to 0.935 ng/ml), <4% and <5% for E₂; 0.083 ng/ml (range: 0 to 16 ng/ml), <10% and <9% for T; 1.3 pg/ml (range: 0.78 to 100 pg/ml), <9% and <13% for 11KT; and 0.06 ng/ml (range: 0.312 to 20 ng/ml), <9% and <13% for DHP.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the free software R version 3.3.1. For all dependent variables, homogeneity of variances was tested using Levene test (leveneTest, package 'car', Fox and Weisberg, 2011). For sex steroids, GSI, latency time, survival rate, hatching rate and malformation rate, data were analyzed by a linear mixed model (lmer, package 'lme4,' Bates et al., 2015) with hormonal treatment and sampling time as fixed effects, and either the fish and the maturation stage at P0 (experiment 1) or only the fish (experiment 2) as random effects: model = lmer(Y ~ treatment × sampling_time + (1|fish) + (1|maturation_stage) with Y: dependent variable. For model validation, residuals were tested for homogeneity and normality using residual v. fitted value and sample v. theoretical quantile (Q-Q) plots, respectively (plotresid, package 'RVAideMemoire,' Hervé, 2016). If necessary, data were log transformed, root square transformed or arcsin root square transformed (only

for data expressed in percentage). When the model was validated, an ANOVA table was performed to calculate F-tests (Anova, package 'car,' Fox and Weisberg, 2011) followed by a least-squares means (predicted marginal means) multiple comparison between treatments, sampling times and/or their interaction as *post hoc* test (lsmeans, package 'lsmeans', Lenth, 2016). When data, even transformed, did not meet the assumptions for the linear mixed model, we used the aligned rank transformation for non-parametric factorial analysis (aligned.rank.transform, package 'ART,' Villacorta, 2015) followed by a pairwise comparison using Dunn test (posthoc.kruskal.dunn.test, package 'PMCMR,' Pohlert, 2016). For the ovulation rate, data were analyzed with a χ² test (chisq.test, package 'MASS,' Venables and Ripley, 2002). Data are expressed as mean ±SEM. The level of significance used in all tests was P < 0.05.

Results

Experiment 1

Effect of dopamine receptor antagonists alone on reproductive performance. In fish treated with hCG, 100% of ovulation was recorded associated with higher GSI and progression of FOM (3 to 5 stages) than in the other groups. In the latter, similar GSI and progression of FOM (0 to 3) were noted. Consequently, MCP and SCH failed to induce ovulation and did not trigger a significant progression of FOM (Table 1).

Effect of dopamine receptor antagonists alone on plasma steroid concentrations. Plasma T and 11KT levels varied significantly as a function of the interaction between hormonal treatments and sampling times (P < 0.05; Figure 1). Only females injected with hCG showed a significant decrease in T and 11KT concentrations between 24 h and the final sampling time (P < 0.001). However, no significant difference in plasma androgen levels was observed between the groups at each sampling time.

Only a time effect was monitored for E₂ with a drop observed at the final sampling time compared with 0 h and 24 h (P < 0.01; Figure 2a).

Table 1 Effect of hormonal treatments on reproductive performance¹ in pikeperch females

Parameters	Treatments												P-value
	Controls ²				Antagonist groups ³								
	NaCl	SEM	hCG	SEM	MCP 4	SEM	MCP 20	SEM	SCH 0.8	SEM	SCH 4	SEM	
GSI (%)	13.5 ^A	0.3	19.5 ^B	1.3	11.8 ^A	0.8	11.6 ^A	1.4	11.5 ^A	0.8	10.4 ^A	0.4	<0.001
FOM prog	0 to 1		3 to 5		0 to 1		0 to 3		0 to 1		0 to 1		<0.001
OR (%)	0 ^A		100 ^B		0 ^A		17 ^A		0 ^A		0 ^A		<0.001
LT (h)			53.4	6.2			47.1						

GSI = gonado-somatic index; FOM prog = final oocyte maturation progression; OR = ovulation rate; LT = latency time (time between injection and ovulation); NaCl = saline solution; hCG = human chorionic gonadotropin; MCP 4 or MCP 20 = metoclopramide at 4 mg/kg or 20 mg/kg; SCH 0.8 or SCH 4 = SCH23390 at 0.8 mg/kg or 4 mg/kg.

¹Reproductive performance parameters are GSI, FOM prog, OR and LT.

²Controls include negative control (NaCl) and positive control (hCG).

³Antagonist groups are treatments with one dopamine receptor antagonist (SCH or MCP).

^{A,B}Means within the same row with different superscripts differ significantly at P < 0.001.

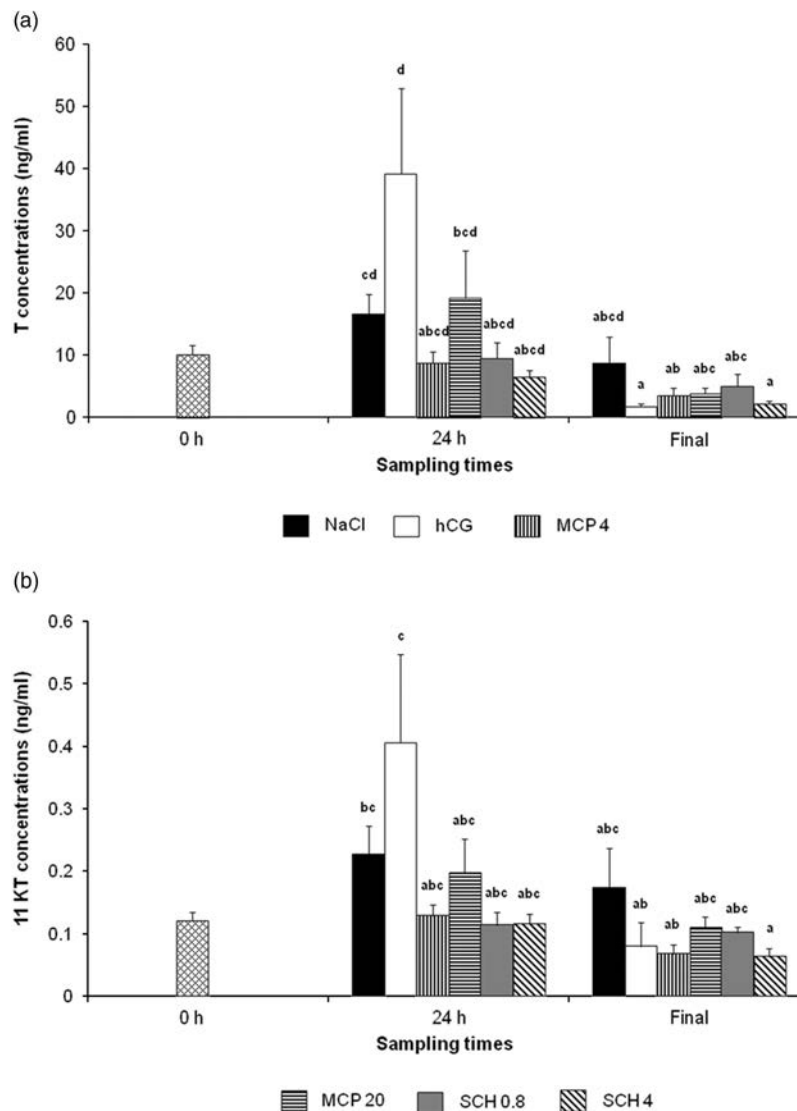


Figure 1 Effect of hormonal treatments on plasmatic concentrations of (a) testosterone (T) and (b) 11 ketotestosterone (11KT) in pikeperch. Fish were injected with NaCl (0.9%, $n=5$), human chorionic gonadotropin (hCG) (500 IU/kg, $n=5$), MCP 4 or MCP 20 (metoclopramide at 4 mg/kg ($n=6$) or 20 mg/kg ($n=7$), respectively) and SCH 0.8 or SCH 4 (SCH23390 at 0.8 mg/kg ($n=6$) or 4 mg/kg ($n=7$), respectively). Blood was sampled at three sampling times: 0 and 24 h after injection and at the time of ovulation or 7 days after injection (if ovulation did not occur; final). Values are means \pm SEM. ^{a,b,c,d}Different letters indicate significant differences for the interaction between hormonal treatments and sampling times ($P < 0.05$).

No significant difference related to hormonal treatments and sampling times was obtained for plasma DHP levels (Figure 2b).

For all steroid levels, high variability was observed.

Experiment 2

Effect of dopamine receptor antagonists in combination with salmon gonadotropin-releasing hormone analogue on reproductive performance. Only the negative control group did not promote the progression of FOM and ovulation. All the other treatments triggered 100% of ovulation. The latency time and zootechnical parameters (survival rate, hatching rate, malformation rate) were similar in all the groups (Table 2).

Effect of dopamine receptor antagonists in combination with salmon gonadotropin-releasing hormone analogue on plasma steroid concentrations. Plasma T concentrations

showed significant differences related to the interaction between hormonal treatments and sampling times ($P < 0.001$; Figure 3a). All hormonal treatments induced a marked increase in T compared with the negative control at 24 h ($P < 0.05$). At 48 h, the SCH 0.8, SCH 4, MCP 4 and hCG treatments were still effective in maintaining higher T levels compared with the negative control ($P < 0.05$). At the final sampling time, all hormonal treatments reduced the T concentrations ($P < 0.05$). The comparison between sGnRHa alone and the combination of DA receptor antagonists with sGnRHa showed that T levels increased with SCH 4 at 48 h ($P < 0.01$).

Concerning 11KT, significant differences were observed related to the interaction between hormonal treatments and sampling times ($P < 0.001$; Figure 3b). All hormonal treatments induced an increase in 11KT levels at 24 h and

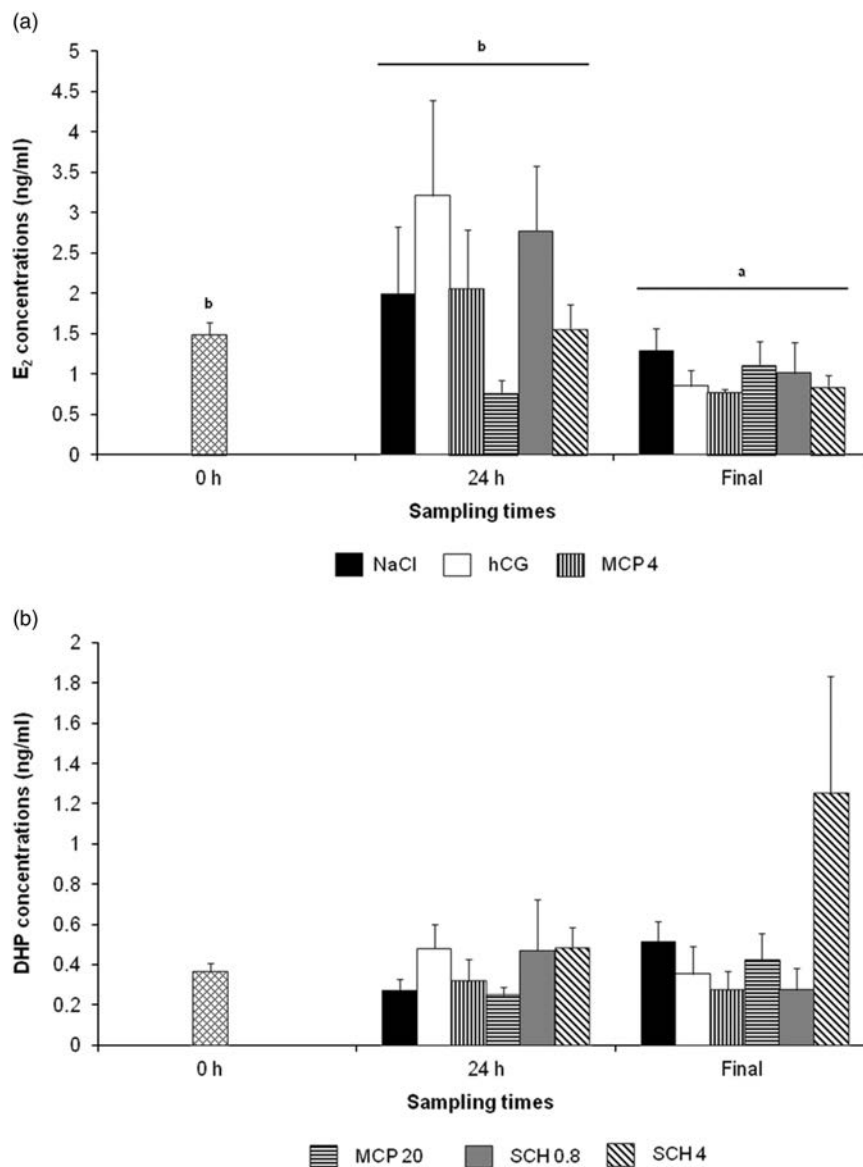


Figure 2 Effect of hormonal treatments on plasmatic concentrations of (a) 17β estradiol (E₂) and (b) 17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) in pikeperch. Fish were injected with NaCl (0.9%, *n* = 5), human chorionic gonadotropin (hCG) (500 IU/kg, *n* = 5), MCP 4 or MCP 20 (metoclopramide at 4 mg/kg (*n* = 6) or 20 mg/kg (*n* = 7), respectively) and SCH 0.8 or SCH 4 (SCH23390 at 0.8 mg/kg (*n* = 6) or 4 mg/kg (*n* = 7), respectively). Blood was sampled at three sampling times: 0 h and 24 h after injection and at the time of ovulation or 7 days after injection (if ovulation did not occur; final). Values are means ± SEM. ^{a,b}Different letters indicate significant differences between sampling times (*P* < 0.05).

48 h (*P* < 0.001), while at the final sampling time they were significantly abolished but only after SCH and MCP 20 treatments (*P* < 0.001). However, for each sampling time, the DA receptor antagonist failed to change the 11KT level compared with the sGnRH_a treatment alone.

For E₂, concentrations varied significantly as a function of the interaction between hormonal treatments and sampling times (*P* < 0.001; Figure 4a). All hormonal treatments induced an increase in E₂ levels at 24 h and 48 h (*P* < 0.05) except for MCP 4 and SCH 4 at 24 h, and sGnRH_a and MCP 4 at 48 h. At the final sampling time, all treatments decreased E₂ levels (*P* < 0.01). Here also, there was not any significant difference between sGnRH_a alone and the combination of DA receptor antagonists

with sGnRH_a except with SCH 0.8 at 48 h which increased E₂ levels (*P* < 0.01).

No significant difference related to hormonal treatments and sampling times was obtained for plasma DHP levels (Figure 4b).

Mild variability was observed for all steroid levels.

Discussion

This study investigated, for the first time, the potential regulatory effects of DA receptor antagonists alone on reproductive mechanisms in pikeperch. Our results first confirmed the high effectiveness of hCG in inducing the progression of FOM and ovulation in this species (Zarski *et al.*, 2015).

Table 2 Effect of hormonal treatments on reproductive performance¹ in pikeperch females

Parameters	Treatments												P-value	
	Controls ²				Antagonist groups with GnRH ³									
	NaCl	hCG	SEM	sGnRHa	SEM	MCP 4	SEM	MCP 20	SEM	SCH 0.8	SEM	SCH 4		SEM
FOM prog	0 to 1	6		6		6		6		6		6		
OR (%)	0 ^A	100 ^B		100 ^B		100 ^B		100 ^B		100 ^B		100 ^B		< 0.001
LT (h)		129.7	5.4	136.9	20.0	168.5	32.6	208.3	17.0	187.8	27.1	159.7	37.6	> 0.05
SR (%)		46.8	8.1	15.0	10.7	28.3	7.7	44.0	15.2	41.5	10.2	24.7	18.0	> 0.05
HR (%)		32.0	8.3	11.8	10.5	21.0	7.0	37.0	13.4	36.5	12.8	9.0	5.5	> 0.05
MR (%)		22.6	4.1	40.7	26.9	34.5	15.5	14.3	3.2	35.5	3.9	38.5	28.5	> 0.05

FOM prog = final oocyte maturation progression; OR = ovulation rate; LT = latency time (time between injection and ovulation); SR = survival rate; HR = hatching rate; MR = malformation rate; NaCl = saline solution; hCG = human chorionic gonadotropin; sGnRHa = analogue of gonadotropin-releasing hormone; MCP 4 or MCP 20 = metoclopramide at 4 mg/kg or 20 mg/kg; SCH 0.8 or SCH 4 = SCH23390 at 0.8 mg/kg or 4 mg/kg.

¹Reproductive performance parameters are FOM prog, OR, LT, SR, HR and MR.

²Controls include negative control (NaCl) and positive controls (hCG and sGnRHa).

³Antagonist groups with sGnRHa are treatments combining GnRH with one dopamine receptor antagonist (SCH or MCP).

^{A,B}Means within the same row with different superscripts differ significantly at $P < 0.001$.

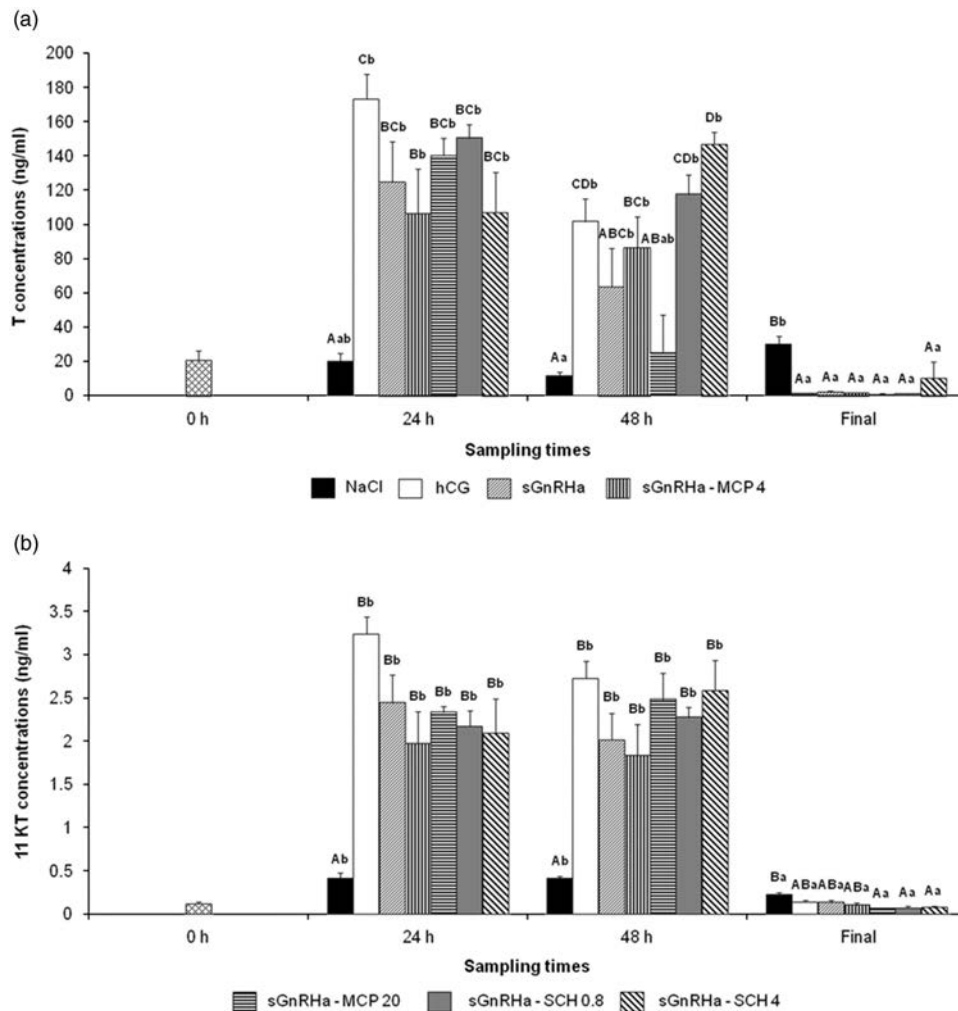


Figure 3 Effect of hormonal treatments on plasmatic concentrations of (a) testosterone (T) and (b) 11 ketotestosterone (11KT) in pikeperch. Fish were injected with NaCl (0.9%, $n=9$), human chorionic gonadotropin (hCG) (500 IU/kg, $n=7$), salmon gonadotropin-releasing hormone analogue (sGnRHa) (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=7$), sGnRHa (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in combination with MCP 4 or MCP 20 (metoclopramide at 4 mg/kg ($n=6$) or 20 mg/kg ($n=5$), respectively) or with SCH 0.8 or SCH 4 (SCH23390 at 0.8 mg/kg ($n=7$) or 4 mg/kg ($n=6$), respectively). Blood was sampled at four sampling times: 0, 24 and 48 h after injection and at the time of ovulation or 14 days after injection (if ovulation did not occur; final). Values are means \pm SEM. ^{A,B,C,D}Different capital letters indicate significant differences between hormonal treatments for the same sampling time ($P < 0.05$). ^{a,b}Different lowercase letters indicate significant differences between sampling times for the same hormonal treatment ($P < 0.05$).

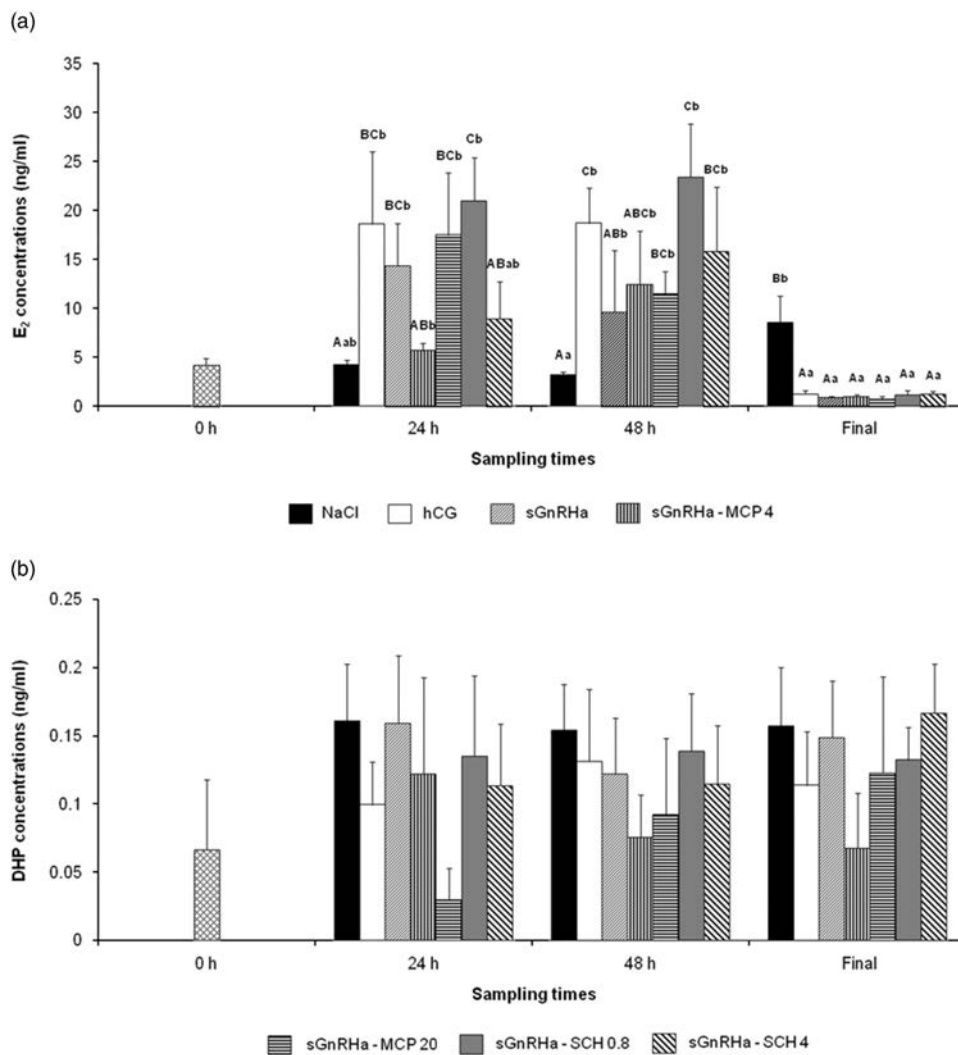


Figure 4 Effect of hormonal treatments on plasmatic concentrations of (a) 17 β estradiol (E₂) and (b) 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) in pikeperch. Fish were injected with NaCl (0.9%, $n=9$), human chorionic gonadotropin (hCG) (500 IU/kg, $n=7$), salmon gonadotropin-releasing hormone analogue (sGnRH α) (25 μ g/kg, $n=7$), sGnRH α (25 μ g/kg) in combination with MCP 4 or MCP 20 (metoclopramide at 4 mg/kg ($n=6$) or 20 mg/kg ($n=5$), respectively) or with SCH 0.8 or SCH 4 (SCH23390 at 0.8 mg/kg ($n=7$) or 4 mg/kg ($n=6$), respectively). Blood was sampled at four sampling times: 0, 24 and 48 h after injection and at the time of ovulation or 14 days after injection (if ovulation did not occur; final). Values are means \pm SEM. ^{A,B,C}Different capital letters indicate significant differences between hormonal treatments for the same sampling time ($P < 0.05$). ^{a,b}Different lowercase letters indicate significant differences between sampling times for the same hormonal treatment ($P < 0.05$)

During FOM, oocytes undergo a phenomenon of hydration inducing, in turn, an increase in follicle weight (Mañanós *et al.*, 2008). After hCG treatment, the rise in GSI may thus stem from the hydration process even if the latter remains to be demonstrated in pikeperch. Contrary to this positive control, no antagonist treatments were found to induce either GSI increase or ovulation. The latter finding is in accordance with previous reports on the Senegalese sole (Guzman *et al.*, 2011) and the common tench, *Tinca tinca* (Podhorec *et al.*, 2016). In contrast, Cejko and Kucharczyk (2015) showed that the injection of MCP induces ovulation in the crucian carp. This inter-species difference may be due to variable potency of the DA inhibition as already suggested (Mañanós *et al.*, 2008; Żarski *et al.*, 2015). Consequently, we hypothesize that DA receptor antagonists applied alone would be ineffective in inducing ovulation in pikeperch because of a weakness in the DA inhibition during

the spontaneous progression of FOM. Alternatively, we might speculate that the doses chosen were not sufficient to generate a GnRH and/or LH endogenous surge. However, when combined with sGnRH α , these DA receptor antagonists do not prevent sGnRH α from triggering ovulation. They do not thus appear as inhibitors of the final stages of gametogenesis in pikeperch. Conversely, DA receptor antagonists would not by themselves allow the reproductive performance to be improved or impaired.

The DA receptor antagonists alone did not induce significant changes in the sex-steroid levels. These results are in accordance with prior studies in striped bass, *Morone saxatilis* (King *et al.*, 1994), and in Senegalese sole (Guzman *et al.*, 2011) in which application of the D2 DA receptor antagonist did not modify the T and E₂ levels in plasma. The attempt to block the D1 receptor family did not succeed in

altering those hormonal levels as well. The ineffectiveness of DA receptor antagonists alone in changing the sex-steroid secretion is consistent with the absence of effect on the ovulation and progression in oocyte maturation. In addition, this would indicate absence of or weakness in the dopaminergic inhibition by the application of D1 or D2 receptor antagonist at the tested doses during the non-hormonally manipulated oocyte maturation process in pikeperch.

Interestingly, we observed that the hCG treatment was unequally effective in inducing changes in the sex-steroid levels. These results are quite surprising considering that this molecule is a common substitute for natural (endogenous) fish LH, which induces fish spawning by direct action on gonads and sex-steroid levels (Mylonas *et al.*, 2010). Considering our results from experiment 1, we noticed that at the same sampling time (e.g. 24 h), fish exhibited different stages of oocyte maturation, contrary to the synchronous stages in experiment 2. This high inter-individual variability may have induced a larger range in steroid concentrations among the fish, which could potentially explain statistically irrelevant endocrine response following hCG treatment. However, other differences between the two populations (e.g. environmental conditions, stress status, final number of individuals) may also explain this difference in sensitivity to hCG. However, some features of the experimental setup, notably the realization of two independent experiments, the low number of hormonal treatments but repeated over time, the usual number of individuals per group (King *et al.*, 1994; Barry *et al.*, 1995; Guzman *et al.*, 2011), lead us to think that the statistical power of the tests were sufficient to detect some potential effects.

The sGnRHa treatment stimulated the production of sex-steroids confirming the widely observed activation of the gonadotropic axis in finfishes after such a treatment (Yaron and Levavi-Sivan, 2011). Interestingly, T and E₂ production were stimulated when sGnRHa was complemented with SCH depending on the dose. These results lead us to hypothesize that SCH would boost the sGnRHa effect on T and E₂ secretion. To our knowledge, this is the first report of plasma sex-steroid change after exposure to D1 receptor family antagonist in fish. Either this antagonist would directly block the D1 receptors at the gonad level as shown in rats (Venegas-Meneses *et al.*, 2015), which in turn would stimulate the ovarian steroidogenesis. Or, the blockage of those receptors in the brain would disrupt the aromatase activity and the further metabolism of T and E₂ (Marsh *et al.*, 2006; Popesku *et al.*, 2012). Also, the blockage of D1 receptors could induce a surge in blood LH (Popesku *et al.*, 2010) which would stimulate the sex-steroid production. Finally, we cannot rule out some indirect effects of SCH through other metabolic factors. Further studies would be needed to check the presence of those receptors in the ovary and to test these regulations by investigating the aromatase expression and activity in brain and oocytes as well as LH in the blood plasma.

Plasma DHP concentrations remained basal and stable over time in all the treatments. In many teleosts, the steroid

DHP is the maturation-inducing steroid (MIS) (Nagahama and Yamashita, 2008). Progression of FOM was found to be linked to a significant increase in DHP levels in walleye, *Sander vitreus* (Barry *et al.*, 1995), and in striped bass (Mylonas *et al.*, 1997). However, in our study, even after application of hCG or sGnRHa with which all the fish ovulated, no peak of DHP concentration was observed. Surprisingly, these results are not consistent with GnRH commonly known effects on the gonadotrope axis (Yaron and Levavi-Sivan, 2011) and with a prior study in which hCG induced an increase in plasma DHP levels during the progression of FOM in white perch, *Morone americana*, and white bass, *Morone chrysops* (King *et al.*, 1995). Several hypotheses may explain these findings. First, as reported in walleye, the DHP could be rapidly removed from the plasma after its conjugation to a non-immunodetectable molecule such as 17,20-P-sulphate or 17,20-P-glucuronate (Scott and Canario, 1992). Second, in a closely related species, the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, Migaud *et al.* (2003) found very low DHP levels in plasma and suggested that these levels may be higher in the early morning than at other times. Due to experimental conditions, our sampling times were performed at the beginning of the afternoon, so we may have missed the peak of detectable DHP in the blood plasma. Third, a close hormone, the 17 α ,20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S or 17,20, 21-P), identified as MIS in other perciforms (Nagahama and Yamashita, 2008) could also play this role in pikeperch. That would explain the mild level of DHP in this species, even after injection with hCG or sGnRHa. Nevertheless, although Barry *et al.* (1995) demonstrated that 20 β -S was not detectable in walleye, others studies conducted with an other perciform, the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, suggested that DHP and 20 β -S could be both considered as MIS (Sorbera *et al.*, 1999; Asturiano *et al.*, 2000). From this latter study, it appears that DHP would be involved in the initiation of the oocyte maturation, just before our first sampling time, potentially explaining the absence of DHP detection in our study. From a general point of view, the absence of progesterin peaks in the plasma can be due to their local and transitory actions into the gonad rendering them difficult to detect using the blood analyses. This indicates that both methodical and physiological studies on MIS in pikeperch should be reconsidered in the future. In any case, by considering DHP as the primary MIS in pikeperch, the lack of DA receptor antagonist effects (positive or negative) on FOM progression would support the absence of DHP regulation by these treatments.

In conclusion, this study, in the current experimental conditions, showed the ineffectiveness of DA receptor antagonist treatments alone, whatever the receptor family (D1 or D2), in inducing sex-steroid changes, FOM and ovulation in pikeperch. Combined with sGnRHa, these DA receptor antagonists did not prevent sGnRHa from triggering ovulation. However, in this combination with sGnRHa, SCH but not MCP proved efficiency to increase sGnRHa-stimulated steroid levels. Thus, only SCH would be involved in the regulation of sex-steroids indicating a putative

potentiator effect of sGnRHa through D1 DA receptor blockage. The use of *in vitro* biological tests of organ culture (e.g. brain, pituitary and ovary) could be useful in the future to pinpoint these endocrine mechanisms.

Acknowledgements

This study was partly supported by the Eurostars project (E!9390 TRANSANDER), the Lorraine region, and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, projects CENAKVA (No. CZ.1.05/2.1.00/01.0024) and CENAKVA II (No. LO1205 under the NPU I programme).

Declaration of interest

None.

Ethics statement

Fish were handled according to the European and French legislation for fish welfare and approved by the institutional Ethics Committee (APAFIS-2016022913149909).

Software and data repository resources

Data are not deposited in an official repository.

References

Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carillo M and Zanuy S 2000. Hormonal regulation of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology* 56, 1155–1172.

Barry TP, Malison JA, Lapp AF and Procarione LS 1995. Effects of selected hormones and male cohorts on final oocyte maturation, ovulation, and steroid production in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture* 138, 331–347.

Bates D, Machler M, Bolker B and Walker S 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48.

Cardinaud B, Sugamori KS, Coudouel S, Vincent JD, Niznik HB and Vernier P 1997. Early emergence of three dopamine D1 receptor subtypes in vertebrates. *The Journal of Biology Chemistry* 272, 2778–2787.

Cejko BI, Kowalski RK, Kucharczyk D, Targonska K, Krejszef S, Źarski D and Glogowski J 2010. Influence of the length of time after hormonal stimulation on selected parameters of milt of ide *Leuciscus idus* L. *Aquaculture Research* 41, 804–813.

Cejko BI and Kucharczyk D 2015. Application of dopaminergic antagonist: metoclopramide, in reproduction of crucian carp *Carassius carassius* (L.) under controlled conditions. *Animal Reproduction Science* 160, 74–81.

Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K and Pasqualini C 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology* 76, 129–160.

Falahatkar B and Poursaeid S 2014. Effects of hormonal manipulation on stress responses in male and female broodstocks of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture International* 22, 235–244.

Food and Agriculture Organization of the United Nations 2017. Cultured aquatic species information programme. *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758). Retrieved on 10 July 2017 from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sander_lucioperca/en

Fox J and Weisberg S 2011. *An R companion to applied regression*, 2nd edition. Sage Publications, Inc, Los Angeles, CA, USA.

Guzman JM, Cal R, Garcia-Lopez A, Chereguini O, Kight K, Olmedo M, Sarasquete C, Mylonas CC, Peleteiro JB, Zohar Y and Mañanós EL 2011. Effects of *in vivo* treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 158, 235–245.

Hervé M 2016. RVAideMemoire: diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9-61.

Kapsimali M, Vidal B, Gonzalez A, Dufour S and Vernier P 2000. Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D1 receptor subtypes in the brain of the European eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D1 receptors in vertebrates. *The Journal of Comparative Neurology* 419, 320–343.

Kestemont P, Dabrowski K and Summerfelt RC 2015. *Biology and culture of percid fishes: principles and practices*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

King W, Berlinsky DL and Sullivan CV 1995. Involvement of gonadal steroids in final oocyte maturation of white perch (*Morone americana*) and white bass (*M. chrysops*): *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology and Biochemistry* 14, 489–500.

King W, Thomas P, Harrell RM, Hodson RG and Sullivan CV 1994. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *General and Comparative Endocrinology* 95, 178–191.

Lenth R 2016. Least-squares means: the R package lsmeans. *Journal of Statistical Software* 69, 1–33.

Mañanós EL, Duncan N and Mylonas CC 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species* (ed. E Cabrita, V Robles and MP Herraes), pp. 3–80. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA.

Marsh KE, Creutz LM, Hawkins MB and Godwin J 2006. Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, *Thalassoma bifasciatum*: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. *Brain Research* 1126, 91–101.

Migaud H, Mandiki R, Gardeur JN, Fostier A, Kestemont P and Fontaine P 2003. Synthesis of sex steroids in final oocyte maturation and induced ovulation in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* 16, 380–388.

Mylonas CC, Fostier A and Zanuy S 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165, 516–534.

Mylonas CC, Scott AP and Zohar Y 1997. Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology* 108, 223–236.

Nagahama Y and Yamashita M 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation* 50, 195–219.

Podhorec P, Socha M, Ben Ammar I, Sokolowska-Mikolajczyk M, Brzuska E, Milla S, Gosiewski G, Stejskal V, Simko M and Kouril J 2016. The effects of GnRHa with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in tench *Tinca tinca*. *Aquaculture* 465, 158–163.

Pohlert T 2016. The Pairwise Multiple Comparisons of Mean Ranks package (PMCMR), R package.

Popesku JT, Martyniuk CJ, Denslow ND and Trudeau VL 2010. Rapid dopaminergic modulation of the fish hypothalamic transcriptome and proteome. *PLoS ONE* 5, e12338.

Popesku JT, Martyniuk CJ and Trudeau VL 2012. Meta-type analysis of dopaminergic effects on gene expression in the neuroendocrine brain of female goldfish. *Frontiers in Endocrinology* 3, 1–24.

Scott AP and Canario AVM 1992. 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate: a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *General and Comparative Endocrinology* 85, 91–100.

Sorbera LA, Asturiano JF, Carillo M, Cerda J, Kime DE and Zanuy S 1999. *In vitro* oocyte maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary extract and steroids. *Journal of Fish Biology* 55, 9–25.

Venables WN and Ripley BD 2002. *Modern applied statistics with S*, 4th edition. Springer, New York, NY, USA.

Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juarez CE, Moran JL, Moran C, Rosas-Murrieta NH, Handal A and Dominguez R 2015. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine* 50, 783–796.

Villacorta PJ 2015. ART: Aligned rank transform for nonparametric factorial analysis, R package version 1.0. 1–5.

Yaron Z and Levavi-Sivan B 2011. Endocrine regulation of fish reproduction. In *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment* (ed. AP Farrell), pp. 1500–1508. Elsevier Inc, San Diego, CA, USA.

Dopamine receptors affect pikeperch reproduction

Yu KL and Peter RE 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 85, 138–146.

Zarski D, Horvath A, Held JA and Kucharczyk D 2015. Artificial reproduction of percid fishes. In *Biology and culture of percid fishes* (ed. P Kestemont, K Dabrowski and RC Summerfelt), pp. 123–161. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Zarski D, Kucharczyk D, Targonska K, Palinska K, Kupren K, Fontaine P and Kestemont P 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research* 43, 713–721.

Zohar Y and Mylonas CC 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136.

**CONTEXTE DU
CHAPITRE II**

CONTEXTE DU CHAPITRE II

La problématique de ce premier chapitre reposait sur (1) l'absence de traitement hormonal idéal pour induire l'ovulation chez le sandre mais également sur (2) le manque d'informations disponibles dans la littérature sur l'existence d'un système dopaminergique, et notamment des récepteurs D₁, pouvant réguler l'axe gonadotrope mais également la maturation méiotique ovocytaire et l'ovulation.

Pour répondre à cette problématique, nous avons donc bloqué chaque famille de récepteur par l'intermédiaire d'un antagoniste spécifique, la SCH23390 pour la famille D₁ et la métoclopramide pour la famille D₂, que nous avons associé ou non à un analogue de la sGnRH. Nous avons observé que le seul blocage des récepteurs de la DA ne permettait ni d'induire l'ovulation ni de réguler la production des stéroïdes sexuels. Des résultats supplémentaires qui n'ont pas été publiés ont également montré que les niveaux d'ARNm de la GnRH-3 et de la LH au niveau cérébral (cette dernière ayant été très peu étudiée jusqu'à présent) mais également de la LH au niveau hypophysaire n'étaient pas non plus régulés par ces antagonistes. Les niveaux d'expression des gènes de la GnRH-1 et 2 n'ont pas pu être mesurés pour des raisons techniques. Par ailleurs, la stimulation de l'axe gonadotrope par la molécule de sGnRH_a associée à un blocage des récepteurs de la DA D₁, et non des récepteurs D₂, a permis de stimuler la production de la T et de l'E₂ plasmatiques sans améliorer les performances de reproduction nous laissant penser à un effet potentialisateur de l'antagoniste D₁ sur l'effet stimulateur de la sGnRH_a.

***In vivo*, la DA serait bien impliquée dans le contrôle de la reproduction du sandre en période pré-ovulatoire et plus spécifiquement dans la régulation de la T et de l'E₂, mais agirait par l'intermédiaire des seuls récepteurs de la famille D₁.**

Toutefois, les mécanismes d'action du système dopaminergique impliqués dans cette régulation sont complètement inconnus et nécessitent d'être éclaircis. Pour cela, l'identification et l'analyse du profil d'expression des récepteurs dopaminergiques présents chez le sandre en période pré-ovulatoire nous permettront d'approfondir ces processus. En effet, d'un côté nous serons capables de vérifier la présence mais également d'évaluer la complexité d'organisation des deux familles de récepteurs dopaminergiques nous permettant d'avoir une idée sur le niveau de complexité des mécanismes dopaminergiques impliqués dans cette régulation. D'un autre côté, l'analyse du profil d'expression permettra d'avoir un

CONTEXTE DU CHAPITRE II

aperçu sur les sites d'actions potentiels de la DA. Par exemple, nous pourrions vérifier si les récepteurs de la DA sont localisés dans les zones cérébrales connues pour être riches en GnRH mais également si la DA ne pourrait pas agir à d'autres niveaux de l'axe gonadotrope (hypophyse, gonades) pour réguler la stéroïdogénèse.

CHAPITRE II

CHAPITRE II

CHAPITRE II

First characterization and distribution of dopamine receptors in pikeperch, *Sander lucioperca*, during the pre-ovulatory period.

Jennifer Roche ^a, Sébastien Hergalant ^b, Amandine Depp ^a, Imen Ben Ammar ^{a,1}, Anne-Gaëlle Lafont^d, Amine Khendek ^a, Tomas Policar ^c, Pascal Fontaine ^a and Sylvain Milla ^a.

^a UR AFPA, USC INRA 340, Université de Lorraine, Boulevard des Aiguillettes, 54506, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b INSERM U1256, Université de Lorraine, Avenue de la Forêt de Haye, 54505, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^c South Bohemian Research Centre of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia, Zatisi 728/II, 389 25, Vodnany, Czech Republic

^d Muséum National d'Histoire Naturelle, Research Unit BOREA (Biology of Aquatic Organisms and Ecosystems), CNRS 7208, IRD 207, Sorbonne Université, Université de Caen Normandie, Université des Antilles, Paris, France.

¹Present address: URBE, Université de Namur, Rue de Bruxelles, 5000, Namur, Belgique.

Corresponding author: Sylvain Milla. Email: sylvain.milla@univ-lorraine.fr

CHAPITRE II

Abstract

Dopamine is an ubiquitous neurotransmitter exerting a range of pleiotropic actions through two dopamine receptor families, the D₁ and the D₂. To date in vertebrates, a maximum of four receptor subtypes have been identified within the D₁ family, D_{1A}, D_{1B}, D_{1C} and D_{1E}, while the D₂ family encloses five subtypes, D₂, D_{2like} (D_{2l}), D₃, D₄ and D_{4-related sequence} (D_{4rs}). Not only each subtype can be encoded by more than one gene according to the species but all of them may not possess all receptors. In teleosts, no study has investigated in parallel all the dopamine receptors to identify and localize the whole receptors repertoire from both families. In pikeperch, *Sander lucioperca*, a species of interest for aquaculture development, the existence, number and location of the dopamine receptors are totally unknown. To address these questions, RNA-seq with *de novo* transcriptome reconstruction, functional annotation and phylogenetic analysis were performed to characterize the transcript repertoire of dopamine receptors in the brain of female pikeperch at the pre-ovulatory period. Then, their gene expression was analysed in a range of tissues. Ten different cDNA were characterized and showed to belong to the D₁ family: two D_{1A}, one D_{1B}, one D_{1Ca} and one D_{1Ca/b} and to the D₂ family: two spliced variants of D₂, one D_{2l}, one D₃ and one D_{4rs}. Unlike zebrafish, the subtypes D_{1E} and D₄ have not yet been isolated in pikeperch. As expected, D_{1A}, D_{2l}, D₃ and D_{4rs} are mostly expressed in brain parts except for the cerebellum (D_{1A} and D₃ mRNAs). In many tissues, the gene expression is receptor-dependent, which may indicate specificities in their physiological involvements. The inter-species differences in the number of dopamine receptors and the inter-organ differences in the gene expression of all receptors support the complexity of the dopaminergic actions in vertebrate.

Keywords: dopamine, receptor, RNA-sequencing, *de novo* transcriptome assembly, phylogeny, multi-tissue gene expression, pikeperch

CHAPITRE II

1. Introduction

Dopamine (DA) is an ubiquitous neurotransmitter found in both central and peripheral nervous systems in many vertebrate species. In the central nervous system, it exerts a range of pleiotropic actions ranging from the control of locomotion, learning, emotion and sexual behaviour to the regulation of pituitary hormone release. This neuro-hormone also plays multiple roles in the peripheral tissues like regulation of the gastrointestinal motility, respiration, blood pressure and insulin secretion (Missale et al., 1998; Ben-Jonathan and Hnasko, 2001; Rubí and Maechler, 2010).

DA actions are mediated through seven transmembrane domain receptors (or G-protein coupled receptors GPCR) divided into two receptor families, namely D₁ and D₂. These receptor families are distinguished according to their intron-exon gene organization, their primary structure, their pharmacological properties and the stimulatory (D₁) or inhibitory (D₂) effects on adenylate cyclase throughout their signalling pathways. Notably, the D₁ receptor genes are intronless, their deduced protein structure exhibit a short third cytoplasmic loop and a long C-terminal tail while the D₂ genes contains introns, and the corresponding receptors a long third cytoplasmic loop and a short C-terminal tail (Missale et al., 1998). According to the authors and databases, different gene and receptor nomenclatures exist, often leading to confusion when it comes to the designation of DA receptors in vertebrates (Yamamoto et al., 2015). Also, the set of genes and receptors existing into each family is dependent of vertebrate groups. During vertebrate evolution, many DA receptor genes and subtypes have been lost in mammals in comparison with non-mammalian species. They kept only two subtypes in the D₁ family (D_{1A}/D₁ and D_{1B}/D₅) and three subtypes in the D₂ family (D₂, D₃ and D₄) each encoded by one gene (Missale et al., 1998; Yamamoto et al., 2015). In addition, in this vertebrate subgroup, the presence of introns in the D₂ family allowed the generation of two receptor variants, D_{2long} (D_{2L}) and D_{2short} (D_{2S}) by an alternative splicing of the D₂ gene (Dal Toso et al., 1989). This phenomenon has

CHAPITRE II

already been found in an amphibian, the bullfrog, *Rana catesbeiana*, but has not yet been found in teleosts, except for the goldfish, *Carassius auratus* (Nakano et al., 2010; Popesku et al., 2011). To date, a maximum of nine DA receptor subtypes have been reported in the clade of Osteichthyes (Yamamoto et al., 2015). Four subtypes would be assigned to the D₁ family, D_{1A}, D_{1B}, D_{1C} and D_{1E} while the D₂ family would enclose five subtypes, D₂, D_{2like} (D_{2l}), D₃, D₄ and D_{4-related sequence} (D_{4rs}). In zebrafish, *Danio rerio*, these nine DA receptors subtypes have been isolated (Yamamoto et al., 2015). In this species, except for D_{1E}, D_{2l} (D_{2b} in Boehmler et al., 2004), D₃ and D_{4rs} (D_{4b} in Boehmler et al., 2007) encoded by a unique gene, the D_{1A}, D_{1B}, D_{1C}, D₂ and D₄ receptor subtypes are encoded by two paralogous genes giving two distinct receptors per subtype, D_{1Aa} and D_{1Ab}, D_{1Ba} and D_{1Bb}, D_{1Ca} and D_{1Cb}, D_{2a} and D_{2b} (called D_{2a} and D_{2c}, respectively in Boehmler et al., 2004), and D_{4a} and D_{4b} (called D_{4a} and D_{4c}, respectively in Boehmler et al., 2007; Yamamoto et al., 2015). As suggested by Yamamoto et al. (2015), these copies likely result from the teleost-specific genome duplication 3R. However, the duplicated copies resulting from 3R may have not been conserved in all teleost species. For example, in common carp, *Cyprinus carpio*, and in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, only one copy of the D₂ receptor gene has been identified (Hirano et al., 1998; Levavi-Sivan et al., 2005) whereas in European eel, *Anguilla anguilla*, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and goldfish, at least two D₂ receptor genes have been found (Vacher et al., 2003; Pasqualini et al., 2009; Popesku et al., 2011). In rainbow trout, these duplicated copies may result directly from the salmonid-specific genome duplication 4R (Dufour et al., 2010). As observed in vertebrate species, there is a high diversity and complexity in the transcript profile of DA receptors, which should be deciphered for each species separately.

This high complexity raises the question about the specificities of each receptor in their respective biological functions. The literature provides some indications that the DA receptors roles depend on the receptor subtype and its location. For instance, receptors D₂ seems to play

CHAPITRE II

an inhibitory or stimulatory role in mammal locomotion whereas receptors D₁ would have little or no effect (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994; Missale et al., 1998). However, a synergistic effect between D₂ and D₁ receptor activation was suggested to increase forward locomotion (Missale et al., 1998). In pikeperch, *Sander lucioperca*, *in vivo* experiments suggested that the D₁ receptor family, but not D₂, is involved in the regulation of sex-steroid production during the final oocyte meiotic maturation (Roche et al., 2018). In zebrafish, Boehmler et al. (2004) suggested that D₂ (D_{2a} and D_{2c}), D₂₁ (D_{2b}) and D₃ receptor subtypes may be involved in visual function. Also, they showed that receptors D_{2a} and D₂₁ (or D_{2b}) are both expressed in the pineal gland but not at the same developmental stage, leading to the possibility of two different roles within this tissue (Boehmler et al., 2004). The study of DA receptor functions is often managed through the investigation of their central and peripheral distributions. However, unlike mammals, data regarding the location of DA receptors are very scarce in teleosts. Using *in situ* hybridization or q-PCR analyses, some studies showed that D₂ receptors are differentially expressed in the brain of species such as European eel, rainbow trout, Nile tilapia, and zebrafish (Vacher et al., 2003; Boehmler et al., 2004; Levavi-Sivan et al., 2005; Pasqualini et al., 2009). D_{2A} and D_{2B} in European eel and the D₂ receptors in rainbow trout display high expression levels in most of the brain areas such as the olfactory bulbs, the telencephalon, the optic tectum, and also in the pituitary (Vacher et al., 2003; Pasqualini et al., 2009). However, in European eel, only D_{2A}, but not D_{2B}, is expressed in the retina, the olfactory epithelium, the spinal cord and the adipose tissue (Pasqualini et al., 2009). Similarly, D₁ receptors are differentially expressed according to the brain areas but only D_{1A1} and D_{1A2} are expressed in the pituitary (Kapsimali et al., 2000). Regarding the location in the peripheral tissues, there are also inter-species peculiarities. Indeed, D₂ receptors are not detected in European eel ovaries, liver, kidney, muscle and gills whereas in Nile tilapia, D₂ receptor gene expression was measured in these tissues, except for kidney and muscle (Levavi-Sivan et al.,

CHAPITRE II

2005; Pasqualini et al., 2009). More information about the presence and abundance level of all dopamine receptors would provide indications about their respective roles in teleost physiology. To date, studies in literature about DA receptors are very scarce, making genomic and protein databases the main informative sources. No study has aimed to identify and locate the full DA receptors repertoire for one given teleost species in a single study.

Pikeperch is a percid fish from the perciform order and a species of interest for aquaculture diversification (Kestemont et al., 2015). Contrary to the situation in cyprinids, salmonids, or anguillids, no data have been evidenced so far on the existence, number and location of DA receptors in percid fishes. Furthermore, few information exist on the expression profile of DA receptors during the final stages of reproduction, a period of huge behavioural and endocrine balance changes. To address these questions, we gathered the repertoire of DA receptors in the brain of maturing pikeperch using whole transcriptome reconstruction from RNA sequencing, analysed their cDNA, inferred protein sequences, compared them with other species and investigated a multi-tissue gene expression pattern of these receptors.

2. Material & Methods

2.1. Animal and sampling procedures

Mature pikeperch females (n=9; 3-4 years old; 1.54 ± 0.07 kg) from Czech Republic (origin: production pond Bynovsky, Fishery Nove Hradky Ltd) were killed by overexposure to anesthesia ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222; 240 mg/L; Sigma-Aldrich, Lyon, France) and quickly sampled for different tissues. Brains from three females were collected and stored at -80°C for subsequent RNA sequencing. Brain and cervical spinal cord from six other fish were dissected out into six different parts: olfactory bulbs, telencephalon including the preoptic area, optic tectum, cerebellum, hypothalamus and spinal cord and stored at -80°C . Pituitary,

CHAPITRE II

ovaries, heart, adipose tissue, muscle, gills, spleen and liver were also collected and stored at -80°C for further DA receptor gene expression analysis.

2.2. Evaluation of oocyte maturation stages

Before tissue samplings, oocyte maturation stages were evaluated for each female according to the classification by Żarski et al. (2012). Briefly, oocytes were sampled using a catheter (CH06; 1.2 mm internal and 2 mm external diameter) and placed in Serra's solution (ethanol/formalin/glacial acetic acid, 6:3:1 v/v/v). After slowly mixing oocytes in Serra's solution and waiting (about 5 min) until the cytoplasm of the oocyte has become clarified, the oocyte maturation stage was evaluated under the binocular microscope, magnification $\times 4$ (Motic® SFC-11 Series, Motic Asia, Hong Kong, China). In pikeperch, the final stages of maturation were divided into seven morphological stages, from stage I to stage VII (ovulation; Żarski et al., 2012). This allowed the determination of the advancement of the oocyte meiotic maturation at the sampling time. Females were evaluated between the stages II and V.

2.3. RNA-seq & *de novo* transcriptome assembly

2.3.1. RNA sequencing

Total RNA from three brain samples was extracted using Isol-RNA reagent (VWR International SAS, Strasbourg, France) according to the manufacturer's protocol. The extracts were then sent to the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, Québec, Canada) where RNA concentration was measured using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) and RNA integrity was assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Libraries were generated from 250 ng of total RNA using the TruSeq stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina), as per the manufacturer's recommendations. Libraries were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay

CHAPITRE II

Kit (Life Technologies) and the Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal kit (Kapa Biosystems). Average fragment size was determined using a LabChip GX (PerkinElmer) instrument.

Whole transcriptome-Seq was then performed using an HiSeq 2500 instrument, generating 125-nucleotide-long paired-end reads which were compiled in FASTQ files complying the format standard. Quality control of sequence reads was done using FastQC v0.11.5 software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Illumina universal adapters were removed with cutadapt v1.11 (Martin, 2013) discarding trimmed reads shorter than 30 nucleotides, with parameters “ -a AGATCGGAAGAGC -A AGATCGGAAGAGC -m 30 --no-indels -O 5 ”. Low quality reads were also filtered, discarding bases with a Phred quality score < 20.

2.3.2. *De novo* transcriptome assembly

The *de novo* transcriptome assembly was carried out using *Trinity* v2.2.0 (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013) without a guiding genome, for stranded libraries (with option – ss_lib_type RF). Assemblies for each pikeperch sample were further evaluated by assessing their read contents - mapping was achieved with *bowtie2* v2.2.8 (Langmead and Salzberg, 2012) - by counting full-length transcripts by sequence alignment with high quality annotations for known proteins (*blastx*, Camacho et al., 2009) was used on the SwissProt database obtained from <http://www.uniprot.org>, and by describing them statistically with *Transrate* v1.0.1 (Smith-Unna et al., 2016). Transcripts were then quantified using *Kallisto* v0.43 (Bray et al., 2016). Identification of likely coding regions within each transcript was performed with *Transdecoder* v3.0.1 (<http://github.com/Transdecoder>), which makes use of *blastp* on SwissProt. Each putative peptide was aligned with *hmmer3.1* (Eddy, 2011) on the PFAM database (Finn et al., 2016) to match with a protein domain. Signal peptide and transmembrane domain predictions

CHAPITRE II

were checked out with *signalP* v4.1. (Petersen et al., 2011) and TMHMM v2.0c (Krogh et al., 2001), respectively. *Rnammer*-1.2 (Lagesen et al., 2007) was used to mark potential rRNA remaining transcripts. All the data produced was finally compiled and submitted to *Trinotate* v3.0.1 (<https://github.com/Trinotate>) to populate an SQLite database representing the functionally annotated transcriptome, along with blast homologies, as well as gene ontology (GO), orthology (eggNOG) and pathway (KEGG) informations (Ashburner et al., 2000; Huerta-Cepas et al., 2016; Kanehisa et al., 2017; The Gene Ontology Consortium, 2017). Annotations were further enriched with custom blasts on a subset of the trEMBL database (<http://www.uniprot.org>) containing all known and predicted DA receptor sequences.

These populated whole transcriptome databases (one for each sample) were extensively used as a dedicated tool for searching and identifying the DA receptors in pikeperch brain. Among the three females, a total of 30 cDNA sequences were obtained. Whenever possible, each identified DA receptor was computationally confirmed using three ways: 1) multiple alignments with orthologous receptors of closely related species, 2) secondary structures alignments (RaptorX, Källberg et al., 2012) with well-characterized DA receptors of the same type were performed to validate and localize functional domains, and 3) the receptor should be found in at least two samples. The degree of identity (%), e-values and bit scores of DA receptor protein sequences between pikeperch and other species were given by *blastp* (Camacho et al., 2009).

2.4. Phylogenetic analysis

Amino acid sequences of 74 osteichthyan receptors from the D₁ family (D_{1A}, D_{1B}, D_{1C}, D_{1E}), and 75 osteichthyan receptors from the D₂ family (D₂, D_{2l}, D₃, D₄, D_{4rs}) were retrieved from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html> release 92)

CHAPITRE II

and Uniprot databases (Supplementary Table 3). These osteichthyan species included sarcopterygians (tetrapods and a basal sarcopterygian, the coelacanth, *Latimeria chalumnae*), and actinopterygians (teleosts and a non-teleost actinopterygian, the spotted gar, *Lepisosteus oculatus*). Human, *Homo sapiens*, adrenergic receptor sequences were used as outgroup.

Multiple sequence alignments of D₁ and D₂ protein families were created using Clustal Omega (Sievers et al., 2011) included in SeaView version 4.6.3 (Gouy et al., 2010) and manually adjusted. Calculation of best amino acid substitution matrix was determined using the ProtTest software version 3.4.2 (Darriba et al., 2011). The JTT (Jones, Taylor and Thornton) protein substitution matrix was selected for both alignments. Phylogenetic analyses were performed with the resulting protein alignments using the Maximum Likelihood method with 1000 bootstrap replicates (RaxML software (Stamatakis, 2014), <http://www.phylo.org>).

2.5. Expression profile analysis of dopamine receptors

2.5.1. Total RNA extraction and reverse-transcription

After total RNA extraction using Isol-RNA reagent (VWR International SAS), a Dnase treatment was performed according to the manufacturer's procedure (Fisher Scientific, Illkirch, France). Reverse transcription (RT) was then achieved using 1 µg/µL of total RNA according to the following procedure: RNA was incubated in 20 µL of a RT reaction mixture: 2 µL of RT buffer (10X; Sigma-aldrich), 1 µL of dNTPs (10 mM; Sigma-aldrich), 1 µL of random nonamers (500 µg/µL; Sigma-aldrich), 0.5 µL of ribonuclease inhibitor (40 U/µL; Thermo scientific, Illkirch, France), 1µL of MMLV (Murine Moloney Leucemia Virus) reverse transcriptase (200 U/µL; Sigma-aldrich) and 13.5 µL of RNase-free water (VWR International SAS). Briefly, RNA, random nonamers and dNTPs were denatured for 10 min at 70°C. At this stage, RT was performed at 37°C for 50 min. Reverse transcriptase was inactivated by heating

CHAPITRE II

samples at 90°C for 10 min. Resulting cDNAs were then stored at -80°C until real-time PCR analysis.

2.5.2. Real-time polymerase chain reaction (q-PCR)

Real-time polymerase chain reaction (q-PCR) was carried out using a StepOne Plus system (Applied Biosystems, Fisher Scientific). cDNAs were diluted 1:20 or 1:40 and 5 µL were used for each q-PCR reaction. Each q-PCR analysis was performed in duplicate using a SYBR Green PCR Master Mix (VWR International S.A.S.) in a total volume of 20 µL per q-PCR well and using 600 nmol/L of primers. After a 10 min incubation step at 95°C, 40 cycles of PCR were performed. Amplification parameters were as follows: each cycle consisted in denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Cycle threshold (Ct) values corresponded to the number of cycles at which the fluorescent signal monitored in real-time was detected above threshold. A standard curve was generated using serial dilutions of a pool of reverse transcribed RNA from tissues of one fish. This curve was used to calculate, using the StepOne software, the relative abundance of target cDNA within analysed samples and the PCR efficiency (from 80% to 120%). After the initial PCR program, a melting curve was realized using the following protocol: 15 s holding followed by a 0.3°C increase from 60°C to 95°C in order to check that a single PCR product was generated. To validate the specificity of the amplification and the absence of amplified genomic DNA, different controls were performed: 1) sample without Dnase treatment, 2) sample without reverse transcriptase and 3) negative controls with RNase-free water. Gene expression was normalized using the geometric mean of two housekeeping genes: Ribosomal Protein L8 (RPL8) and Adenosine Kinase like (AK), whose expression was stable under these conditions (data not shown). Primers used for DA receptors and housekeeping genes were described in Table 1. To ensure that primers were specific of each DA receptor they were designed in unconservative regions such as intra and

CHAPITRE II

extracellular domains, specific to each receptor. All primer pairs were further checked for uniqueness and concordance within each transcriptome using *blastn* with – word size 7 as parameter for small sequence matches. Given that no specific primers for D₂, D_{1Ba} and D_{1C} receptors were found, we only presented the gene expression profile of D_{1Aa}, D_{1Ab}, D_{2l}, D₃ and D_{4rs}.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R version 3.4.0. For all dependent variables, homogeneity of variances was tested using Levene test (`leveneTest`, package ‘car’, Fox and Weisberg, 2011). For relative DA receptors gene expression, data were analysed by a linear mixed model (`lmer`, package ‘lme4’, Bates et al., 2015) with tissues as fixed effects, and either the fish (for repeated measures) and/or the maturation stage at the sampling time as random effects: `model=lmer(Y~tissues+(1|fish)+(1|maturation_stage)` with *Y*: dependent variable. For model validation, residuals were tested for homogeneity and normality using residual *vs* fitted value and sample *vs* theoretical quantile (Q-Q) plots, respectively (`plotresid`, package ‘RVAideMemoire’, Hervé, 2016). If necessary, data were log-transformed or root-square-transformed. When the model was validated, an anova table was performed to calculate F-tests (`Anova`, package ‘car’, Fox and Weisberg, 2011) followed by a Least-squares means (predicted marginal means) multiple comparison between tissues as post-hoc test (`lsmeans`, package ‘lsmeans’, Lenth, 2016). When data, even transformed, did not meet the assumptions for the linear mixed model, we used the kruskal-wallis test for non-parametric analysis with n variable (`kruskal.test`) followed by a pairwise comparison using Dunn test (`posthoc.kruskal.dunn.test`, package ‘PMCMR’, Pohlert, 2016) with Benjamini & Hochberg correction (BH; Benjamini and Hochberg, 1995). Data are expressed as mean ± SEM. The level of significance used in all tests was $P < 0.05$.

CHAPITRE II

3. RESULTS

3.1. Evaluation of the transcriptome assembly

After filtering and trimming low quality reads, sequencing generated an average of 79.9 million read pairs per sample. This led to an average of 272 211 contigs per fish after the Trinity (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013) assembly step. Re-mapping of the respective reads on each transcriptome reached 99.1% match and 97.4% complete, concordant pair re-alignment. N50 calculation, based on the longest transcript per “gene”, was evaluated at 1000, with an average of 659 nt length (median was at 375 nt). GC content was 44.67%. After estimating their relative abundance, transcripts were flagged for sufficient expression with a minimum of 20 reads per contig required. An average of 91 052 transcripts per sample passed this filter. For our purposes, all transcripts were retained anyway until the identification step. Putative proteomes were finally computed from each transcriptome with Transdecoder (<http://github.com/Transdecoder>), which produced an average of 76 976 putative proteins per sample, 40 856 being complete (from the first methionine to the stop codon) and fully annotated. A comprehensive database compiling transcriptomic results was generated at this point (see Material and Methods) and was used throughout the rest of the study.

3.2. Identification and sequence analyses of pikeperch dopamine receptors

Database mining and pairwise comparisons led to the identification of ten distinct cDNAs corresponding to DA receptors. Their deduced amino acid sequences shared high degrees of identity with some teleost and human DA receptors from both D₁ and D₂ families.

Five DA receptors, namely D1_1, D1_2, D1_3, D1_4 and D1_5 (Table 2 and Supplementary Table 1), belonged to the D₁ family (only 21-41% of identity with other human and teleost D₂ receptors family). Among these five receptors, D1_1 and D1_2 displayed the highest sequence identity with human D₁ receptor (range between 72-73%). Relatively to teleost species, D1_1

CHAPITRE II

displayed about 80% of sequence identity with zebrafish and European eel D_{1A} receptors while it displayed a highest identity with the Nile tilapia D_{1Aa} receptor (93%). Pikeperch D1_2 shared high percentage of sequence identity with zebrafish D_{1Ab} (84%), Nile tilapia D_{1Ab} (93%) and European eel D_{1A1} (84%). D1_3 showed 66% of sequence identity with the human D₅ receptor while D1_4 displayed 60% of sequence identity with the human D₁ receptor. Relatively to teleost receptors, D1_3 shared similar sequence identity with zebrafish D_{1Aa} and D_{1Ba} (71-72%) and a high percentage of sequence identity with the Nile tilapia D_{1Ba} (93%) and European eel D_{1B} (85%). D1_4 displayed the highest identity with the zebrafish and Nile tilapia D_{1Ca} (66 and 79%, respectively) and European eel D_{1C} receptor (65%). Finally, D1_5 sequence shared similar sequence identities with human D₁ and D₅ receptors (61-62%) while it displayed the highest sequence identity with zebrafish D_{1Ca} and D_{1Cb} (76%), while it displayed the highest identity with Nile tilapia D_{1Cb} (82%) and European eel D_{1C} (76%) receptors. No pikeperch sequences identified in this study were related to zebrafish and tilapia D_{1Bb} or to zebrafish D_{1E} receptors at these levels of identification.

The five remaining DA receptors, namely D2_1, D2_2, D2_3, D2_4 and D2_5 (Table 3 and Supplementary Table 2), belonged to the D₂ family (with only 29-46% of identity with human and some teleost D₁ receptors family). Among these five receptors, D2_1, D2_2 and D2_3 showed the highest degree of sequence identity with human D₂ receptors (from 55% to 66%). Relatively to teleost species, D2_1 and D2_2 displayed the highest sequence identity with teleost D₂ subtype, the Nile tilapia D₂ (95% and 89%, respectively), European eel D_{2A} (78% and 73%, respectively), European eel D_{2B} (75% and 72%, respectively), zebrafish D_{2a} (73% and 69%, respectively) and zebrafish D_{2b} receptors (73% and 71%, respectively). D2_3 shared highest sequence identity with Nile tilapia D₂₁ (89%) and zebrafish D₂₁ (75%) receptors. Finally, D2_4 and D2_5 shared 58% and 68% of sequence identity with human D₃ and D₄, respectively

CHAPITRE II

while they displayed the highest sequence identities with zebrafish and Nile tilapia D₃ (75-90%) and D_{4rs} (71-76%) receptors, respectively.

Accordingly, we propose the following designation for those ten DA receptor sequences: D_{1Aa} (D1_1), D_{1Ab} (D1_2), D_{1Ba} (D1_3), D_{1Ca} (D1_4), D_{1Cb} (D1_5) and D₂ for two sequences sharing 100% of sequence identity (D2_1 and D2_2), D_{2l} (D2_3), D₃ (D2_4) and D_{4rs} (D2_5).

These 10 putative polypeptides were further aligned with DA receptors from other vertebrate species including human and some teleosts. Two examples from D₁ and D₂ families: D_{1Aa}, D_{1Ab} and both D₂ are shown in Figures 1 and 2, respectively. The other sequence alignments are shown in Supplementary Figures 1, 2, 3, 4 and 5. All sequences are complete except for the predicted pikeperch D_{1Ba} and D_{1Cb} for which two and four of the seven putative transmembrane domains (TMD) are missing, respectively. For both families, the TMD are highly conserved relatively to the TMD of other species. Also, the specific GPCR DRY motif is observed within all sequences, except for the predicted partial D_{1Cb} polypeptide (Supplementary Material). Regarding the D₁ family (Figure 1 and Supplementary Materials), we observed a short third cytoplasmic loop and a long and variable C-terminal tail enclosing a cysteine amino acid at its beginning, except for the partial D_{1Cb}. In contrast, we noticed a long and variable third cytoplasmic loop and a short and relatively well-conserved cytoplasmic tail ending with a cysteine residue for all predicted D₂ receptors. Regarding one of both D₂ sequences, a gap in the protein sequence within the third intracellular loop (29 missing amino acids) was observed (Figure 2). The two D₂ sequences are thus now named D_{2Long} (D_{2L}) and D_{2Short} (D_{2S}) like in mammals. Highly conserved amino acid residues between pikeperch and other vertebrate species were also observed in TMD and extracellular and cytoplasmic loops. For instance, we observed one conserved aspartate in TMD II and III, one asparagine in TMD VII, two serines in TMD V and two cysteines in extracellular loops I and II (Figure 2).

CHAPITRE II

3.3. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses of DA receptors amino acid sequences were performed to confirm the identity of the predicted pikeperch sequences.

Regarding the D₁ family (Figure 3), the phylogeny analysis clustered D_{1C}, D_{1A} and D_{1B} sequences in three well-supported clades, with bootstrap values of 91, 98 and 67%, respectively. However, the few D_{1E} sequences retrieved from the available databases were not encompassed in a single monophyletic clade. The D_{1A} clade was composed of two distinct subclades: a sarcopterygian and an actinopterygian, with the non-teleost actinopterygian spotted gar branching with the root of the actinopterygian clade, in accordance with its phylogenetical position. Teleost D_{1A} sequences were separated into two clades, named D_{1Aa} and D_{1Ab}. Pikeperch D1_1 and D1_2 sequences branched individually within each one of these clades, confirming their identification as D_{1Aa} and D_{1Ab}. D_{1B} sequences were separated into three clades: a sarcopterygian clade, an actinopterygian clade, which including the spotted gar D_{1B} branching with D_{1Ba} teleost sequences, and a third clade enclosing D_{1Bb} teleost sequences. The D1_3 pikeperch sequence branched together with the D_{1Ba} teleost sequences, confirming its place in the nomenclature as D_{1Ba}. Concerning D_{1C}, two sarcopterygian sequences branched with the root of the actinopterygian clade encompassing the spotted gar D_{1C} and two well-supported teleost clades, each one including a pikeperch D₁ sequence. Pikeperch D1_4 were thus named D_{1Ca} and D1_5 D_{1Cb}, respectively.

Concerning the D₂ family, phylogenetic analysis clustered all vertebrate sequences in two strongly-supported clades, D₄/D_{4rs} (100%) on one side and D₃/D₂/D_{2like} (91%) on the other side. A clear demarcation was observed between D₄ (80%) and D_{4rs} (89%) sequences among the D₃/D₂/D_{2like} clade. Among the D₃/D₂/D_{2like} clade, D₃ (90%), D₂ (78%) and D_{2like} (68%)

CHAPITRE II

sequences diverged into three subclades. Into each one of the D₄, D_{4rs}, D₃, D₂ and D_{2like} subclades, a well-supported actinopterygian branch was defined.

The spotted gar D₄ sequence branched with the root of the two teleost D₄ clades, D_{4a} and D_{4b}, while the spotted gar D_{4rs} branched with a single teleost D_{4rs} clade, including the pikeperch D_{2_5} sequence. The spotted gar D₃ sequence branched with the root of a single teleost D₃ clade, including the D_{2_4} pikeperch sequence. Accordingly, these pikeperch sequences were respectively named D_{4rs} and D₃. Similarly, the spotted gar D_{2like} sequence branched together with the coelacanth D_{2like} one, within a single teleost D_{2like} clade, including the D_{2_3} pikeperch sequence. The spotted gar D₂ sequence branched with the root of two well-supported clades, named D_{2a} (73%) and D_{2b} (60%). The pikeperch D_{2L} sequence branched together with other teleost D_{2a} sequences. Thus, the two pikeperch D₂ sequences (D_{2_1} and D_{2_2}), differing only by a contiguous sequence of 29 amino acids, correspond to the long and short isoforms of a single D₂ gene, hereby named D_{2a} (D_{2aL} and D_{2aS}). No pikeperch sequences orthologous to vertebrate D₄ were evidenced in this study.

3.4. Multi-tissue mRNA abundance of dopamine receptors from the D₁ and D₂ families in pikeperch

3.4.1. Gene expression profile of D_{1Aa} and D_{1Ab}

The same profile of expression was observed for both genes in the brain (Figures 5A and B), in which they were mainly expressed in the brain and predominantly in the olfactory bulbs and the optic tectum. They were also highly expressed in the telencephalon, in the spinal cord and in the hypothalamus. However, both gene expressions were lower in the cerebellum and in the pituitary at intermediate levels between the brain parts and the tested peripheral tissues.

Regarding these latter tissues, they were both undetectable in muscle, adipose tissue, gills and spleen as well as in the liver and heart for D_{1Ab}.

CHAPITRE II

3.4.2. Gene expression of D₂₁, D₃ and D_{4rs}

The three genes were mainly expressed in the brain (Figures 5C, D and E). The D₂₁ and D_{4rs} genes were predominantly expressed in the optic tectum (D₂₁ and D_{4rs}) but also in the olfactory bulbs, telencephalon, hypothalamus and spinal cord for the D_{4rs} while D₃ was mostly expressed in the telencephalon. D₂₁ gene was also highly expressed in the spinal cord, the hypothalamus and the cerebellum while its expression levels were weaker in the olfactory bulbs and the telencephalon. D₃ gene expression was high in the olfactory bulbs, the hypothalamus and weaker in the optic tectum and the spinal cord. Finally, the D_{4rs} gene had a lower but detectable expression in the cerebellum on the contrary to the D₃ gene that was just above the detection limit.

In the pituitary, the D₂₁ gene was expressed at intermediate levels while D₃ and D_{4rs} mRNA abundances were relatively high. In the ovaries, D₂₁ and D₃ gene expressions were above the detection limit while the D_{4rs} was undetectable. D₃ gene expression was intermediate in the heart. Finally, the gene expression was above the detection limit in the liver (D₂₁ and D₃), heart (D₂₁ and D_{4rs}), muscles (D₂₁) and gills (D₃) and undetectable in the remaining tissues.

4. Discussion

In this study, we identified ten DA receptor mRNA isolated from the brain of pikeperch at the pre-ovulatory period. This work is the second aiming at isolating all the DA receptors belonging to both D₁ and D₂ families for one teleost species.

Five DA receptor sequences were attributed to the D₁ family using amino acid sequence comparisons and phylogenetic analyses. These sequences share between 52% and 93% of sequence identity with other vertebrate D₁ receptors and only 21-41% with vertebrate D₂ receptors. Besides the seven TMDs found in complete sequences and the DRY sequence

CHAPITRE II

specific of GPCR, these receptors share common features with D₁ receptors characterized in other vertebrate species, including mammals and teleosts. Among these characteristics, we observed the short third intracellular cytoplasmic loop and a long unvariable C terminal cytoplasmic tail enclosing a conserved cysteine residue allowing to anchor the receptor to the membrane (Civelli et al., 1993; Missale et al., 1998; Ben-Jonathan and Hnasko, 2001). Some conserved amino acid residues allowing the receptor functionality and regulation were also observed. For instance, we found an aspartate in TMD 2 and 3 or two serines in TMD 5 that form the narrow pocket for the ligand binding, two cysteines in the first and second extracellular loop that allow the stabilization of the receptor conformation with a disulfide bond, or also some phosphorylation/glycosylation sites in the different cytoplasmic and extracellular loops (Civelli et al., 1993; Missale et al., 1998). Phylogenetic analysis assigned these five pikeperch sequences to specific DA receptor clades, D_{1A}, D_{1Ba} and D_{1C} (Cardinaud et al., 1997; Yamamoto et al., 2015). Thus, we assume that pikeperch possess at least five DA receptor genes orthologous to D_{1Aa}, D_{1Ab}, D_{1Ba}, D_{1Ca} and D_{1Cb}.

These different D₁ receptor paralogs have already been identified in literature or have been released in the relevant databases.

A single D_{1A} receptor was identified in sarcopterygian species, such as mammals, birds and amphibians, in the non-teleost actinopterygian spotted gar and in the teleost goldfish while two D_{1A} receptors were found in several teleost species, including European eel, common carp, zebrafish and Nile tilapia (Cardinaud et al., 1997; Demchyshyn et al., 1995; Frail et al., 1993; Hirano et al., 1998; Macrae and Brenner, 1995; Missale et al., 1998; Sugamori et al., 1994; Yamamoto et al., 2015; NCBI, Ensembl and Uniprot databases). The two teleost D_{1A} paralogs likely result from the teleost specific genome duplication (3R). The pikeperch would have conserved these two D_{1A} paralogs, as most of the teleosts.

CHAPITRE II

In the same way, two D_{1C} receptors were identified in pikeperch, as in other teleosts, such as Atlantic herring, *Clupea harengus*, zebrafish, and Nile tilapia, while a single D_{1C} is present in sarcopterygians and in non-teleost actinopterygian (Yamamoto et al., 2015). In European eel, japanese medaka, *Oryzias latipes*, japanese pufferfish (fugu), *Takifugu rubripes*, and three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, only one D_{1C} paralog was identified (Sugamori et al., 1994; Macrae and Brenner, 1995; Lamers et al., 1996; Cardinaud et al., 1997; Hirano et al., 1998). These results suggest that the two D_{1C} identified in the pikeperch are issued from 3R, and that one copy may have been lost in some species throughout teleost radiation.

Concerning D_{1B}, a single receptor is present in sarcopterygians, while two D_{1B} receptors were evidenced in some teleosts species, such as japanese medaka, three-spined stickleback, Nile tilapia, fugu and Atlantic herring (Sugamori et al., 1994; Demchyshyn et al., 1995; Cardinaud et al., 1997; Hirano et al., 1998; Missale et al., 1998; Yamamoto et al., 2015 NCBI, Ensembl and Uniprot databases). In contrast, only one D_{1B} receptor, orthologous to the pikeperch D1_3, was evidenced in European eel, Asian bonytongue, *Scleropages formosus*, zebrafish and European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Sugamori et al., 1994; Demchyshyn et al., 1995; Cardinaud et al., 1997; Hirano et al., 1998; Missale et al., 1998; Yamamoto et al., 2015 NCBI, Ensembl and Uniprot databases). From the phylogenetic analysis, the single spotted gar D_{1B} branched with the root of the teleost D_{1Ba} clade, and in polytomy with the sarcopterygian and the teleost D_{1Bb} (named D_{1X} in Hirano et al., 1998) clades. This result does not suggest that the two teleost D_{1B} paralogs result from 3R. As this study was based on brain transcriptome analysis, and with the absence of a pikeperch genome in the available databases, we cannot ascertain the absence of a D_{1Bb} paralog in this species.

Five receptor sequences, belonging to the D₂ receptor family, have herein been identified in pikeperch. These sequences share from 33% to 95% identity with other D₂ receptors in

CHAPITRE II

vertebrates and only 29-46% with D₁ ones. The molecular structure is also consistent with the one described in other vertebrate species: the seven TMDs, the long variable third cytoplasmic loop and a short and conserved C terminal tail ending with a conserved cysteine residue. Similarly to the D₁ receptors, some conserved amino acid residues were also observed in pikeperch D₂ sequences. For instance, the primary structure possesses the aspartate in TMD 2 and 3, the two serines in TMD 5, the two cysteines in the first and second extracellular loops or the phosphorylation/glycosylation sites in the different loops (Civelli et al., 1993; Missale et al., 1998; Levavi-Sivan et al., 2005). Phylogenetic analysis revealed that the pikeperch D₂ receptors are orthologous to D₂, D₂₁, D₃ and D_{4rs}. From our study based on brain transcriptome analysis, we could not evidence in the pikeperch the presence of 3R-paralogs belonging to the D₂ receptor family, suggesting a loss of all these duplicated copies during evolution in our species. In the absence of an available genome for this species, this question remains open.

All these D₂ family receptors have been previously identified in vertebrates including several teleost species.

For instance, a D₂₁ sequence was cloned in zebrafish (Boehmler et al., 2004), and identified *in silico* in other actinopterygians, such as spotted gar, Nile tilapia, japanese medaka and a sarcopterygian, the coelacanth (Yamamoto et al., 2015; NCBI, Ensembl and Uniprot databases). Phylogenetic analysis clearly revealed that the actinopterygian and sarcopterygian D₂₁ sequences clustered in a single clade distinct to the other vertebrate D₂. Our results are consistent with Boehmler et al. (2004) and Yamamoto et al. (2015), suggesting that this receptor could be the product of an early gene duplication within the Osteichthyes group.

In the D₂₁ sister clade, encompassing D₂ sequences, two paralogs have been evidenced in European eel, Asian bonytongue, Atlantic herring and zebrafish, likely resulting from 3R (Vacher et al., 2003; Boehmler et al., 2004; Pasqualini et al., 2009; Popesku et al., 2011; NCBI

CHAPITRE II

database). In contrast, only one D₂ receptor gene could be identified in pikeperch, as in other teleost, such as japanese medaka, tilapia and fugu, suggesting the loss of the duplicated paralog in these species. This D₂ gene encodes for two identical receptors D_{2aL} and D_{2aS}, except for a 29 amino acid sequence missing in the third cytoplasmic loop of the D_{2aS}. This has already been reported in some mammals including human and rat (Dal Toso et al., 1989; Monsma et al., 1989; Missale et al., 1998) but also in bullfrog (Nakano et al., 2010). Taking advantage of the phylogenetic results, regarding the mammalian model and the full identity between both sequences, we suggest an alternative splicing of the pre-messenger of the unique D_{2a} gene in pikeperch. This phenomenon has been described before in goldfish (Popesku et al., 2011), but to date this has never been confirmed in another teleost. Nevertheless, no alternative splicing has been highlighted in a wide range of vertebrate species including xenopus (Martens et al., 1993), fugu (Macrae and Brenner, 1995), common carp (Hirano et al., 1998), rainbow trout (Vacher et al., 2003), zebrafish (Boehmler et al., 2004), Nile tilapia (Levavi-Sivan et al., 2005) and in European eel (Pasqualini et al., 2009). Taking into account the involvement of the third cytoplasmic loop in the coupling to the protein G, it has been proposed that this splicing could be involved in the functional diversity of the D₂ receptors (Missale et al., 1998; Ben-Jonathan and Hnasko, 2001; Callier et al., 2003). Indeed, Senogles et al., (2004) suggested that the splice variants could be coupled to a different G_i protein. Other authors showed that both isoforms are differently distributed in cells or tissues and even possess distinct functions. They showed that, besides their distinct expression in the brain, the D_{2S} receptor could be presynaptically located while the D_{2L} may be found in the post-synaptic region in mammals (Khan et al., 1998). Conversely, Tress et al. (2017) suggested that most annotated splice variants could lead to unfunctional proteins at a cellular level. In addition to this debate around the physiological roles of these variants, the link between the occurrence of this alternative splicing and the phylogeny remains unclear. Indeed, the absence of this D₂ splicing is commonly reported in teleosts. Lu et

CHAPITRE II

al. (2010) suggested that this splicing phenomenon might be an evolutionary mechanism. They showed a negative correlation between the teleost genome size and the alternative splicing rate, leading to more protein diversity in small genomes. However, this hypothesis does not explain the absence of such D₂ splicing in species with a small genome such as Fugu. The other hypothesis raised by Macrae and Brenner (1995) that this splicing took place recently in the vertebrate lineage is not consistent with our results nor with those of Popesku et al. (2011) in goldfish. Indeed, as reported by the latter, in addition to what was observed in mammals and bullfrog, this splicing could exist in one other teleost species, the three-spined stickleback, and could give it the status of ancestral phenomenon. However, in three-spined stickleback, these spliced variants stem from a genome-sequencing project and has never been experimentally verified. Further research conducted on a wide range of vertebrate species would be needed to understand this splicing phenomenon.

Relatively to D₃, a single copy has been evidenced in some mammals, sauropsids and some teleosts such as fugu, zebrafish, japanese medaka, European seabass, and Nile tilapia (Macrae and Brenner, 1995; Missale et al., 1998; Boehmler et al., 2004; Yamamoto et al., 2015; NCBI database). This suggests that the 3R duplicated D₃ paralogs may have been lost shortly after the teleost emergence.

In the same way, a single copy of D_{4rs} was cloned in zebrafish (Boehmler et al., 2007) and was identified in databases in some other teleost species such as Nile tilapia, japanese medaka, in the non-teleost actinopterygian spotted gar and the sarcopterygian coelacanth (Yamamoto et al., 2015; NCBI, Ensembl and Uniprot databases). This suggests again an early loss of D_{4rs} 3R-paralogs during teleost radiation.

Concerning the D₄ subtype, 3R duplicated paralogs are present in some teleosts, such as zebrafish, Atlantic herring, Asian bonytongue and European eel, while a single copy has been

CHAPITRE II

evidenced in Nile tilapia, platyfish, japanese medaka, and fugu (Boehmler et al., 2007; NCBI, Ensembl and Uniprot databases). This suggests that different loss events may have occurred during teleost radiation. In the present study, based on transcriptome analysis, no dopamine receptor orthologous to D₄ has been evidenced in the pikeperch.

Few studies have investigated D₄ and D_{4rs} subtypes in teleosts besides Boehmler et al. (2007), which reported three distinct genes encoding those receptors, two genes encoding the D₄ subtype (D_{4a} and D_{4b} (or D_{4c})) and a single gene encoding the D_{4rs} subtype. As suggested in previous studies, the existence of D₄ and D_{4rs} subtypes would result from a duplication event that occurred after the split between the cyclostome and the gnathostome clade (Boehmler et al., 2007; Yamamoto et al., 2015).

Several hypotheses may explain the absence of D_{1Bb}, D_{1E}, D_{2b} and both D₄ paralogs in all female pikeperch specimens analysed in the present study. First, some receptors like D_{1E} and D_{2b} may have been lost during vertebrate evolution in most of the teleost lineages (Dufour et al., 2010; Yamamoto et al., 2015). Other paralogs, like D_{1Bb}, may have been lost only in some perciform species, including pikeperch. Second, we may also speculate that the genes encoding some of these receptors would correspond to unfunctional pseudogenes (Prince and Pickett, 2002) whose transcripts remain undetectable in the brain. To address these questions, an exhaustive genome sequencing in pikeperch would be useful. Third, the present study analysed the transcripts during the prespawning period, a highly specific physiological situation. This event of final oocyte maturation is synchronous with huge alterations of the brain and gonad transcriptomes. We may preclude low and barely detectable gene expression of these receptors before ovulation in pikeperch (Aegerter et al., 2004). Fourth, we cannot rule out the fact that the lack of identification may stem from methodological limitations (e.g. assembly, incomplete reference databases).

CHAPITRE II

All DA receptors have not an undetectable gene expression in pikeperch. Indeed, all the multi-tissues gene expression patterns revealed a specific and measurable expression for D_{1Aa}, D_{1Ab}, D_{2l}, D₃ and D_{4rs}.

As expected, we observe a high expression of D_{1A} and D₃ DA receptors mRNA in the brain parts in accordance with the well-known neurophysiological roles of dopamine and its receptors in the central nervous system such as locomotion, sensory perception and neuro-endocrine regulation (Missale et al., 1998; Dufour et al., 2010). This study also reveals this high cerebral gene expression for D_{2l} and D_{4rs}, raising the possibility of such implication in pikeperch physiology. The brain profile also showed a part-specific gene expression of these receptors. For instance, the two D_{1A} are ubiquitously expressed in the brain except for the cerebellum where the expression is slightly lower. These low levels of D_{1A} mRNA in the cerebellum have previously been showed in mammals and European eel (Mansour et al., 1991; Mengod et al., 1992; Laurier et al., 1994; Cardinaud et al., 1997; Kapsimali et al., 2000). On the contrary, some receptors mRNA are present in the brain parts related to sensory perception. For instance, D_{4rs} is highly expressed in the olfactory bulbs, which might indicate a role for the DA/D_{4rs} receptor complex in olfaction and perhaps in reproductive behavior (Kasumyan, 2004). Interestingly, all DA receptors studied are expressed in the brain regions related to the reproductive function, the telencephalon, including the preoptic area, and the hypothalamus. GnRH neurons are highly present in the preoptic area (Lethimonier et al., 2004; Gopurappilly et al., 2013), suggesting that DA may potentially interact with and regulate the GnRH system through both receptor families in pikeperch telencephalon. However, the complete investigation of the involvement of these receptors (mRNA and proteins) in pikeperch brain needs to be completed, notably by using an *in situ* hybridization or immunohistochemistry analyses and/or some behavioral tests. Pituitary showed intermediate and low transcript abundance for the two D_{1A} whereas this level was higher for the D₂ family receptors. Using specific DA receptor antagonists, it was

CHAPITRE II

demonstrated that the D₂ family receptors, rather than the D₁ ones, might be involved in gonadotropin secretion (Dufour et al., 2010; Fontaine et al., 2015). Nevertheless, we recently showed that *in vivo* treatment with a D₁ receptor antagonist increased the T and E2 plasmatic levels, while no effect was observed with a D₂ receptor antagonist (Roche et al., 2018). We thus imagine that this divergence between both DA receptor families localization in the pituitary is not linked to the activation of the gonadotropic axis in pikeperch at this pre-ovulatory period. In the gonad, the gene expression is either just above the quantification limit (D_{1Aa} and D_{4rs}) or simply low (D_{1Ab}, D_{2l}, D₃). Given this level of detection, we cannot rule out any direct effect of dopamine through its receptors on ovarian mechanisms (Isobe, 1994; Venegas-Meneses et al., 2015). To shed some light on this question, the use of *in vitro* follicle culture exposed to DA and its receptor antagonists would be a future guide to pinpoint these biological processes. Finally, depending on the receptor type, the expression level is also just detectable in heart, liver or gills, which might be put in relation with involvements of DA in osmoregulatory mechanisms, heart beats and energetic metabolism in teleost fish (Missale et al., 1998; Rubí and Maechler, 2010). In the spleen, muscle and adipose tissue, no expression was observable, which allows us to conclude on the non-involvement of these receptors in these tissues.

In summary, five D₁ DA receptors, D_{1Aa}, D_{1Ab}, D_{1Ba}, D_{1Ca} and D_{1Cb} and five D₂ DA receptors, D_{2L} and D_{2S}, D_{2l}, D₃ and D_{4rs}, sharing features specific to each DA receptor family, were identified in pikeperch during the pre-ovulatory period. Presence of two receptor families (D₁ and D₂), multiple receptor subtypes (D_{1A}, D_{1B}, D_{1C}, D₂, D_{2l}, D₃ and D_{4rs}), some paralogs for some subtypes (D_{1A} and D_{1C}) and even spliced variants (D_{2aL} and D_{2aS}) highlight the complexity of DA receptors in teleost fish. These receptors are specifically and differentially expressed into the different brain areas, in the pituitary but also in some peripheral tissues (gonads, heart, liver, gills) indicating a role of DA through one of its receptors into different physiological functions

CHAPITRE II

such as the osmoregulation or the cardio-vascular functions. The distribution of these receptors in the brain, pituitary and gonads leads us to think that the DA may be involved in the neuro-endocrine regulation such as the regulation of the reproductive function.

Acknowledgements: We thank the DyNAMIC and LAE laboratories (University of Lorraine, France) for the access to the NanoDrop Spectrophotometer and the q-PCR thermocycler, respectively.

Funding: This work was supported by the Eurostars project [grant numbers E!9390 TRANSANDER]; the Region Lorraine and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, projects CENAKVA (No CZ.1.05/2.1.00/01.0024) and CENAKVA II (No. LO1205 under the NPU I program).

Bibliography

- Aegerter S, Jalabert B and Bobe J 2004. Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* 67, 127–135.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM and Sherlock G 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25–29.
- Bates D, Maechler Martin, Bolker B and Walker S 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *Journal of statistical software* 67, 1–48.
- Ben-Jonathan N and Hnasko R 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine*

CHAPITRE II

- Reviews 22, 724–763.
- Benjamini Y and Hochberg Y 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B and Levenson R 2004. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental Dynamics* 230, 481–493.
- Boehmler W, Carr T, Thisse C, Thisse B, Canfield VA and Levenson R 2007. D4 dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes, Brain and Behavior* 6, 155–166.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P and Pachter L 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34, 525–527.
- Callier S, Snapyan M, Crom S, Prou D, Vincent J-D and Vernier P 2003. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biology of the Cell* 95, 489–502.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K and Madden TL 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421.
- Cardinaud B, Sugamori KS, Coudouel S, Vincent J-D, Niznik HB and Vernier P 1997. Early emergence of three dopamine D1 receptor subtypes in vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 2778–2787.
- Civelli O, Bunzow JR and Grandy DK 1993. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 33, 281–307.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD and Seeburg PH 1989. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *The EMBO Journal* 8, 4025–4034.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit

CHAPITRE II

- models of protein evolution. *Bioinformatics Applications Note* 27, 1164–1165.
- Demchyshyn LL, Sugamori KS, Lee FJ, Hamadanizadeh SA and Niznik HB 1995. The dopamine D1D receptor. Cloning and characterization of three pharmacologically distinct D1-like receptors from *Gallus domesticus*. *The Journal of biological chemistry* 270, 4005–4012.
- Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K and Pasqualini C 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology* 76, 129–160.
- Eddy SR 2011. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Computational Biology* 7, e1002195.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J and Bateman A 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44, D279–D285.
- Fontaine R, Affaticati P, Bureau C, Colin I, Demarque M, Dufour S, Vernier P, Yamamoto K and Pasqualini C 2015. The dopaminergic neurons controlling anterior pituitary functions: anatomy and ontogenesis in zebrafish. *Endocrinology* 156, 2934–2948.
- Fox J and Weisberg S 2011. *An R companion to applied Regression*. SAGE Publications, Inc.
- Frail DE, Manelli AM, Witte DG, Lin CW, Steffey ME and Mackenzie RG 1993. Cloning and characterization of a truncated dopamine D1 receptor from goldfish retina: stimulation of cyclic AMP production and calcium mobilization. *Molecular Pharmacology* 44.
- Gopurappilly R, Ogawa S and Parhar IS 2013. Functional significance of GnRH and kisspeptin, and their cognate receptors in teleost reproduction. *Frontiers in Endocrinology* 4, 1–13.
- Gouy M, Guindon S and Gascuel O 2010. SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221–224.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L,

CHAPITRE II

- Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N and Regev A 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29, 644–52.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N and Regev A 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8, 1494–1512.
- Hervé M 2016. RVAideMemoire: diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9-61.
- Hirano J, Archer SN and Djamgoz MB 1998. Dopamine receptor subtypes expressed in vertebrate (carp and eel) retinae: cloning, sequencing and comparison of five D1-like and three D2-like receptors. *Receptors & channels* 5, 387–404.
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, Cook H, Heller D, Walter MC, Rattei T, Mende DR, Sunagawa S, Kuhn M, Jensen LJ, von Mering C and Bork P 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research* 44, 286–293.
- Isobe S 1994. The role of the dopaminergic system in the rat ovary. *Folia Endocrinologica Japonica* 70, 457–464.
- Jackson DM and Westlind-Danielsson A 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology Ther* 64, 291–369.
- Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H and Xu J 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7, 1511–1522.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y and Morishima K 2017. KEGG: new

CHAPITRE II

- perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 45, D353–D361.
- Kapsimali M, Vidal B, Gonzalez A, Dufour S and Vernier P 2000. Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D1 receptor subtypes in the brain of the European eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D1 receptors in vertebrates. *Journal of Comparative Neurology* 419, 320–343.
- Kasumyan AO 2004. The olfactory system in fish : structure, function, and role in behavior. *Journal of Ichthyology* 44, 180–223.
- Kestemont P, Dabrowski K and Summerfelt RC 2015. Biology and culture of percid fishes: Principles and practices. Springer. p. 901
- Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A and Goldman-Rakic PS 1998. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7731–7736.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G and Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes | Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology* 305, 567–580.
- Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Stærfeldt H-H, Rognes T and Ussery DW 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* 35, 3100–3108.
- Lamers AE, Groneveld D, De DP V, Felix K, Geeraedts CG, Leunissen B' JAM, Flik G, Sjoerd, Wendelaar Bonga E and Martens GJM 1996. Cloning and sequence analysis of a hypothalamic cDNA encoding a D1C dopamine receptor in tilapia. *Biochimica et Biophysica Acta* 1308, 17–22.
- Langmead B and Salzberg SL 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357–359.

CHAPITRE II

- Laurier LG, O'dowd BF and George SR 1994. Heterogeneous tissue-specific transcription of dopamine receptor subtype messenger RNA in rat brain. *Molecular Brain Research* 25, 344–351.
- Lenth R 2016. Least-Squares Means: The R package lsmeans. *Journal of Statistical Software* 69, 1–33.
- Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA, Lareyre JJ and Kah O 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 135, 1–16.
- Levavi-Sivan B, Aizen J and Avitan A 2005. Cloning, characterization and expression of the D2 dopamine receptor from the tilapia pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 236, 17–30.
- Lu J, Peatman E, Wang W, Yang Q, Abernathy J, Wang S, Kucuktas H and Liu Z 2010. Alternative splicing in teleost fish genomes: same-species and cross-species analysis and comparisons. *Molecular Genetics and Genomics* 283, 531–539.
- Macrae AD and Brenner S 1995. Analysis of the dopamine receptor family in the compact genome of the puffer fish *Fugu rubripes*. *Genomics* 25, 436–446.
- Mansour A, Meador-Woodruff J.H., Zhou Q-Y, Civelli O, Akil H and Watson SJ 1991. A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiography and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* 45, 359–371.
- Martens GJM, Groenen PMA, Van Riel MCHM and Martens G 1993. Expression of the *Xenopus* D2, dopamine receptor. Tissue-specific regulation and two transcriptionally active genes but no evidence for alternative splicing. *European Journal of Biochemistry* 213, 1349–1354.
- Martin M 2013. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12.

CHAPITRE II

- Mengod G, Villaro MT, Landwehrmeyer GB, Martinez-Mir MI, Niznik HB, Sunahara RK, Seeman P, O'dowd BF, Probst A, Palacios JM and Research P 1992. Visualization of dopamine D1, D2 and D3 receptor mRNA's in human and rat brain. *Neurochemistry International* 20, 33–43.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78, 189–225.
- Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC and Sibley DR 1989. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342, 926–929.
- Nakano M, Hasunuma I, Okada R, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T and Kobayashi T 2010. Molecular cloning of bullfrog D2 dopamine receptor cDNA: tissue distribution of three isoforms of D2 dopamine receptor mRNA. *General and Comparative Endocrinology* 168, 143–148.
- Pasqualini C, Weltzien F-A, Vidal B, Baloché S, Rouget C, Gilles N, Servent D, Vernier P and Dufour S 2009. Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tissue-specific transcription, and regulation by sex steroids. *Endocrinology* 150, 1377–1392.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G and Nielsen H 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8, 785–786.
- Pohlert T 2016. The Pairwise Multiple Comparisons of Mean Ranks package (PMCMR), R Package.
- Popesku JT, Navarro-Martín L and Trudeau VL 2011. Evidence for alternative splicing of a dopamine D2 receptor in a teleost. *Physiological and biochemical zoology* : PBZ 84, 135–46.
- Prince VE and Pickett FB 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nature reviews* 3, 827–837.

CHAPITRE II

- Roche J, Źarski D, Khendek A, Ben Ammar I, Broquard C, Depp A, Ledoré Y, Policar T, Fontaine P and Milla S 2018. D1, but not D2, dopamine receptor regulates steroid levels during the final stages of pikeperch gametogenesis. *animal*, 1–11.
- Rubí B and Maechler P 2010. Minireview: New roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance. *Endocrinology* 151, 5570–5581.
- Senogles SE, Heimert TL, Odife ER and Quasney MW 2004. A region of the third intracellular loop of the short form of the D2 dopamine receptor dictates Gi coupling specificity. *The Journal of biological chemistry* 279, 1601–6.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD and Higgins DG 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.
- Smith-Unna R, Bournsnel C, Patro R, Hibberd JM and Kelly S 2016. TransRate: reference-free quality assessment of *de novo* transcriptome assemblies. *Genome research* 26, 1134–44.
- Stamatakis A 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics Applications* 30, 1312–1313.
- Sugamori KS, Demchyshyn LL, Chung M and Niznik HB 1994. D1A, D1B, and D1C dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 10536–10540.
- The Gene Ontology Consortium 2017. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research* 45, 331–338.
- Tress ML, Abascal F and Valencia A 2017. Alternative splicing may not be the key to proteome complexity. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 98–110.
- Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferrière F, Saligaut C and Kah O 2003. Distribution of dopamine D2 receptor mRNAs in the brain and the pituitary of female rainbow trout: an

CHAPITRE II

in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 458, 32–45.

Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juarez CE, Moran JL, Moran C, Rosas-Murrieta NH, Handal A and Dominguez R 2015. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine* 50, 783–796.

Yamamoto K, Fontaine R, Pasqualini C and Vernier P 2015. Classification of dopamine receptor genes in vertebrates: nine subtypes in Osteichthyes. *Brain Behaviour and Evolution* 86, 164–175.

Żarski D, Kucharczyk D, Targonska K, Palińska K, Kupren K, Fontaine P and Kestemont P 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research* 43, 713–721.

CHAPITRE II

Table 1: Primers used for real-time PCR

	Sequences (5' – 3')		
	Forward	Reverse	Size (bp)
D _{1Aa}	CTTCATCCTCAACTGCATGGT	CCTCCTGGATACAGTCTGTGG	204
D _{1Ab}	CCAGAGAGAGACTCGTCCAAA	TTGCAGAAAGCACCAAACGG	196
D ₂₁	TGCCATCTCCTGCCCTTTAC	CCATCGCCTCCTTTACCAGG	255
D ₃	TGGTGTGCTCCATCTCCAAC	GCCACAGGCAAACCTGACAAC	306
D _{4rs}	CGTCGTAGGGGTTTTTCTAGC	GCAGAGCAGCTTGTGAAAGAC	199
RPL8	GTTATCGCCTCTGCCAC	ACCGAAGGGATGCTCAAC	163
AK	CTTCCTGACCGTCTCTTTGG	CCTTAGTCTCGAAGTCTTGC	209

CHAPITRE II

Table 2: Pairwise comparisons within the D₁ receptor family between pikeperch, zebrafish (ZF) and human (H) receptor protein sequences

Pikeperch		D1_1	D1_2	D1_3	D1_4	D1_5
H D₁	Id % (Sc)	72.75 (513)	72.15 (621)	57.30 (397)	59.53 (439)	61.94 (188)
	e-value	0.0	0.0	1.88e-140	1.28e-154	4.58e-62
H D₅	Id % (Sc)	67.45 (455)	56.76 (477)	66.13 (492)	51.84 (461)	61.24 (197)
	e-value	2.72e-162	1.54e-169	2.75e-177	1.79e-162	3.74e-65
ZF D_{1Aa}	Id % (Sc)	81.03 (570)	82.37 (575)	71.43 (382)	65.63 (435)	62.81 (189)
	e-value	0.0	0.0	1.14e-135	4.06e-154	2.95e-63
ZF D_{1Ab}	Id % (Sc)	79.95 (565)	84.13 (756)	59.07 (404)	62.97 (437)	66.46 (208)
	e-value	0.0	0.0	2.91e-143	1.88e-153	1.26e-69
ZF D_{1Ba} (partial)	Id % (Sc)	64.71 (272)	64.35 (286)	72.19 (421)	58.58 (290)	66.88 (199)
	e-value	2.40e-93	1.20e-97	1.80e-152	8.15e-99	3.73e-68
ZF D_{1Bb}	Id % (Sc)	61.45 (419)	62.08 (417)	59.13 (370)	57.65 (405)	59.24 (171)
	e-value	2.70e-149	1.75e-147	2.21e-130	7.51e-142	6.25e-56
ZF D_{1Ca}	Id % (Sc)	68.31 (476)	57.52 (495)	61.30 (420)	65.77 (597)	76.19 (224)
	e-value	4.59e-171	3.74e-177	2.24e-149	0.0	9.17e-76
ZF D_{1Cb}	Id % (Sc)	70.54 (475)	68.75 (480)	60.28 (409)	59.84 (533)	75.97 (228)
	e-value	4.77e-171	1.05e-171	2.08e-145	0.0	8.43e-78
ZF D_{1E}	Id % (Sc)	62.82 (431)	55.71 (455)	56.43 (377)	59.84 (446)	62.18 (185)
	e-value	2.50e-153	1.22e-161	1.49e-132	4.07e-157	8.21e-61

Id = Identity; Sc = bit Score

CHAPITRE II

Table 3: Pairwise comparisons within the D₂ receptor family between pikeperch, zebrafish (ZF) and human (H) protein sequences

Pikeperch		D2_1	D2_2	D2_3	D2_4	D2_5
H D_{2L}	Id % (Sc)	66.10 (602)	63.23 (557)	56.47 (456)	53.76 (438)	38.48 (262)
	e-value	0.0	0.0	2.94e-161	8.44e-155	7.23e-87
H D_{2S}	Id % (Sc)	62.50 (559)	66.37 (571)	54.98 (436)	53.68 (440)	41.18 (274)
	e-value	0.0	0.0	8.36e-154	4.47e-156	1.13e-91
H D₃	Id % (Sc)	48.89 (388)	53.15 (403)	49.22 (368)	57.72 (449)	40.96 (276)
	e-value	1.32e-135	4.63e-142	1.63e-127	9.23e-160	1.47e-92
H D₄	Id % (Sc)	46.88 (152)	36.49 (228)	53.49 (150)	38.22 (232)	68.04 (228)
	e-value	2.33e-44	6.86e-73	1.76e-43	2.22e-74	2.33e-73
ZF D_{2a}	Id % (Sc)	73.35 (684)	69.44 (632)	54.96 (471)	51.45 (418)	33.63 (265)
	e-value	0.0	0.0	1.92e-167	6.88e-147	6.38e-88
ZF D_{2b}	Id % (Sc)	73.25 (677)	71.15 (617)	58.02 (500)	53.60 (438)	37.09 (276)
	e-value	0.0	0.0	1.15e-178	6.56e-155	4.04e-92
ZF D_{2l}	Id % (Sc)	59.23 (490)	58.47 (457)	74.61 (610)	51.64 (385)	41.06 (271)
	e-value	2.56e-175	7.06e-163	0.0	5.39e-134	1.71e-90
ZF D₃	Id % (Sc)	50.10 (447)	53.06 (456)	49.31 (386)	74.57 (666)	38.02 (270)
	e-value	3.87e-158	8.14e-162	5.62e-134	0.0	1.55e-89
ZF D_{4a}	Id % (Sc)	47.62 (155)	36.62 (228)	36.59 (222)	48.54 (139)	51.39 (343)
	e-value	6.50e-46	5.54e-74	3.04e-71	2.30e-40	2.33e-119
ZF D_{4b}	Id % (Sc)	35.28 (253)	37.53 (258)	35.85 (251)	36.96 (244)	54.10 (394)
	e-value	3.46e-83	2.12e-85	1.90e-82	5.65e-80	5.79e-139
ZF D_{4rs}	Id % (Sc)	37.05 (249)	37.12 (253)	42.48 (274)	39.59 (262)	70.76 (535)
	e-value	3.94e-81	2.15e-83	1.12e-90	1.35e-86	0

D_{2S} = D_{2Short}; D_{2L} = D_{2Long}; D_{2l} = D_{2like}; D_{4rs} = D_{4-related sequence}; Id = Identity; Sc = bit Score

CHAPITRE II

Supplementary Table 1: Pairwise comparisons within the D₁ receptor family between pikeperch, Nile tilapia and European eel receptor protein sequences

Pikeperch		D1_1	D1_2	D1_3	D1_4	D1_5
Tilapia D_{1Aa}	Id % (Sc)	92.74 (674)	79.30 (562)	66.91 (368)	62.19 (434)	61.05 (203)
	e-value	0.0	0.0	5.42e-130	1.46e-153	1.50e-68
Tilapia D_{1Ab}	Id % (Sc)	79.36 (583)	92.66 (883)	57.14 (405)	62.40 (463)	64.29 (206)
	e-value	0.0	0.0	2.01e-143	1.53e-163	1.60e-68
Tilapia D_{1Ba}	Id % (Sc)	67.89 (468)	59.02 (500)	93.47 (685)	55.39 (478)	61.21 (194)
	e-value	7.05e-168	6.48e-179	0.0	1.63e-169	2.48e-64
Tilapia D_{1Bb}	Id % (Sc)	60.21 (437)	61.11 (443)	62.14 (368)	58.07 (426)	54.75 (174)
	e-value	1.94e-155	1.22e-156	6.11e-129	2.81e-149	1.82e-56
Tilapia D_{1Ca}	Id % (Sc)	63.01 (461)	55.82 (481)	56.17 (395)	78.91 (758)	61.70 (207)
	e-value	1.21e-164	4.80e-171	8.39e-139	0.0	1.08e-68
Tilapia D_{1Cb}	Id % (Sc)	68.27 (468)	66.30 (481)	58.97 (391)	59.25 (531)	82.47 (254)
	e-value	5.17e-168	1.27e-171	5.26e-138	0.0	1.02e-87
Eel D_{1A1}	Id % (Sc)	80.00 (565)	83.62 (735)	62.60 (427)	58.50 (452)	66.06 (207)
	e-value	0.0	0.0	2.95e-152	1.08e-159	2.56e-69
Eel D_{1A2}	Id % (Sc)	80.05 (598)	80.13 (731)	59.33 (408)	62.40 (467)	63.47 (201)
	e-value	0.0	0.0	7.38e-145	2.28e-165	5.22e-67
Eel D_{1B}	Id % (Sc)	68.73 (464)	59.91 (496)	85.27 (620)	55.18 (478)	63.19 (197)
	e-value	2.03e-166	1.94e-177	0.0	2.17e-169	2.02e-65
Eel D_{1C}	Id % (Sc)	70.21 (484)	69.60 (492)	63.23 (429)	65.37 (594)	75.80 (246)
	e-value	3.19e-174	4.87e-176	7.73e-153	0.0	2.22e-84

Id = Identity; Sc = bit Score

CHAPITRE II

Supplementary Table 2: Pairwise comparisons within the D₂ receptor family between pikeperch, Nile tilapia and European eel receptor protein sequences

Pikeperch		D2_1	D2_2	D2_3	D2_4	D2_5
Tilapia D₂	Id % (Sc)	94.88 (918)	89.13 (844)	57.02 (496)	52.16 (429)	35.98 (271)
	e-value	0.0	0.0	7.78e-177	5.51e-151	7.16e-90
Tilapia D_{2l}	Id % (Sc)	57.27 (489)	57.64 (460)	88.77 (842)	49.77 (387)	41.76 (283)
	e-value	3.30e-174	4.22e-163	0.0	4.96e-134	1.76e-94
TilapiaD₃	Id % (Sc)	51.16 (435)	52.69 (441)	51.13 (388)	89.50 (832)	37.34 (275)
	e-value	2.78e-153	4.53e-156	1.42 e-134	0.0	8.97e-92
TilapiaD_{4a}	Id % (Sc)	34.73 (238)	37.62 (259)	36.13 (256)	43.72 (173)	53.39 (407)
	e-value	4.31e-77	1.39e-85	5.51e-84	1.09e-52	8.35e-144
Tilapia D_{4b}	Id % (Sc)	33.04 (223)	34.66 (225)	45.55 (164)	36.22 (231)	51.68 (363)
	e-value	1.01e-71	9.68e-73	3.74e-49	4.72e-75	7.81e-127
TilapiaD_{4rs}	Id % (Sc)	36.74 (250)	38.12 (253)	41.95 (263)	39.17 (255)	75.71 (599)
	e-value	9.26e-82	4.82 e-83	1.52e-86	8.90e-84	0.0
Eel D_{2A}	Id % (Sc)	77.83 (729)	73.13 (666)	58.96 (497)	50.52 (427)	37.01 (273)
	e-value	0.0	0.0	1.88 e-177	2.45e-150	4.40e-91
Eel D_{2B}	Id % (Sc)	75.48 (686)	71.73 (635)	59.04 (492)	51.50 (441)	36.77 (268)
	e-value	0.0	0.0	1.63e-175	3.74e-156	9.44e-89

D_{2l} = D_{2like}; D_{4rs} = D_{4-related} sequence; Id = Identity; Sc = bit Score

CHAPITRE II

Supplementary Table 3: ID correspondence and nomenclature for dopamine receptor sequences¹ used in the phylogenetic analysis

Vertebrate species	Latin names	D1 family		D2 family	
		Receptor names	Protein ID	Receptor names	Protein ID
Asian bonytongue (Arowana)	<i>Scleropages formosus</i>	D _{1Aa}	XP_018611872.1	D _{2a}	XP_018598250.1
		D _{1Ab}	XP_018607352.1	D _{2b}	XP_018610682.1
		D _{1Ba}	XP_018590910.1		
		D _{1Ca}	KPP63084.1		
		D _{1Cb}	KPP64030.1		
Atlantic herring	<i>Clupea harengus</i>	D _{1Ab}	XP_012693211.1	D _{2b}	XP_012677409.1
		D _{1Ba}	XP_012696109.1	D ₃	XP_012671515.1
		D _{1Bb}	XP_012686723.1	D _{4rs}	XP_012687376.1
		D _{1Ca}	XP_012685303.1		
		D _{1Cb}	XP_012672788.1		
Cattle	<i>Bos taurus</i>	D _{1A}	Q95136	D ₂	P20288
		D _{1B}	G3X8D2	D ₃	NP_001179824.1
				D ₄	XP_024843396.1
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	D _{1A}	B8YLV8	D ₂	A9YZQ5
		D _{1B}	XP_015141299.1	D ₃	C5HV40
		D _{1E}	XP_004947622.1	D ₄	B6UVA0
Clown fish (Sebae anemonefish)	<i>Amphiprion sebae</i>			D _{2a}	A0A0C5LBQ6
Coelacanth	<i>Latimeria</i>	D _{1A}	XP_005992583.1	D ₂	H3BGA1
	<i>chalunae</i>	D _{1B}	H2ZWY6	D _{2like}	XP_006010333.1
		D _{1C}	H3BEK6	D ₃	XP_014350627.1

CHAPITRE II

		D _{1E}	XP_005995307.1	D ₄	H3B3R1
				D _{4rs}	H3A1X7
European eel	<i>Anguilla</i>	D _{1A1}	Q98841	D _{2a} (D _{2A})	A1XYV7
	<i>anguilla</i>	D _{1A2}	Q98842	D _{2b} (D _{2B})	A1XYV8
		D _{1Ba} (D _{1Ba})	Q98843		
		D _{1Cb} (D _{1c})	Q98844		
European seabass	Dicentrarchus			D ₃	E6ZIT8
	labrax				
Flathead grey mullet	<i>Mugil cephalus</i>			D _{2a}	Q5Y5R5
Fugu (Japanese	<i>Takifugu</i>	D _{1Aa}	XP_003970582.1	D _{2a}	P53453
pufferfish)	<i>rubripes</i>	D _{1Ab} (D14)	P53452	D ₃	XP_003967971.1
		D _{1Ba}	XP_003973600.1	D _{4a}	XP_003967634.1
		D _{1Bb}	XP_011610919.1	D _{4b}	XP_003969784.1
		D _{1Cb} (DL)	P53454		
Golden-line (Golden-	<i>Sinocyclocheilus</i>	D _{1E}	XP_016140732.1		
line barbel)	<i>grahami</i>				
Goldfish	<i>Carassius</i>	D _{1E}	XP_026112506.1	D _{2a1}	XP_026138158.1
	<i>auratus</i>			D _{2a2}	XP_026082110.1
				D _{2b}	XP_026109573.1
				D _{3_1}	XP_026057526.1
				D _{3_2}	XP_026093276.1
				D _{4a1}	XP_026057689.1
				D _{4a2}	XP_026111096.1
				D _{4b}	XP_026122146.1
				D _{4rs1}	XP_026088236.1
				D _{4rs2}	XP_026066271.1

CHAPITRE II

Human	<i>Homo sapiens</i>	D ₁	P21728	D ₂	P14416
		D ₅	P21918	D ₃	P35462
				D ₄	P21917
<i>OUTGROUPS</i>		ADRA1A	NP_000671.2		
		ADRA2B	NP_000673.2		
Lizard	<i>Anolis</i>	D _{1A}	XP_008102998.1	D ₂	H9GEE4
	<i>carolinensis</i>	D _{1B}	H9GGW7	D ₃	G1KJF9
		D _{1E}	XP_003228657.1		
Medaka (Japanese medaka)	<i>Oryzias latipes</i>	D _{1Aa}	XP_011478663.1	D _{2a}	XP_004075461.1
		D _{1Ab}	XP_004076181.1	D _{2like}	NP_001292346.1
		D _{1Ba}	XP_004068909.1	D ₃	XP_004081111.1
		D _{1Bb}	XP_011473350.1	D _{4a}	XP_023811246.1
		D _{1Ca}	XP_020555836.1	D _{4b}	XP_023807515.1
				D _{4rs}	XP_004085072.1
Mozambique tilapia	<i>Oreochromis</i>	D _{1Cb}	P47800		
	<i>mossambicus</i>				
Nile tilapia	<i>Oreochromis</i>	D _{1Aa}	XP_013127197	D _{2a}	Q5Y5R4
		D _{1Ab}	I3KZ49	D _{2like}	XP_005455936.1
		D _{1Ba}	I3KYB9	D ₃	I3K990
		D _{1Bb}	XP_013131143.1	D _{4a}	I3J7W8
		D _{1Ca}	XP_005473811.1	D _{4b}	I3KEQ9
		D _{1Cb}	XP_003449479.1	D _{4rs}	I3JL32
	<i>Paramormyrops kingsleyae</i>			D _{2b}	XP_023672044.1
Platyfish	<i>Xiphophorus</i>			D _{2a}	M4A3B9
	<i>maculatus</i>			D _{2like}	M3ZW15

CHAPITRE II

				D ₃	M4A6N4
				D _{4b}	M4AVC2
				D _{4rs}	M4AF30
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus</i>			D _{2a1}	Q90WQ7
	<i>mykiss</i>			D _{2a2}	Q90WQ6
Rat	<i>Rattus</i>	D _{1A}	P18901	D ₂	P61169
	<i>norvegicus</i>	D _{1B}	P25115	D ₃	P19020
				D ₄	P30729
Spotted gar	<i>Lepisosteus</i>	D _{1A}	W5MY24	D ₂	XP_006642348.1
	<i>oculatus</i>	D _{1B}	W5NNC6	D _{2like}	XP_015224221.1
		D _{1C}	XP_006630355.1	D ₃	W5M5T7
		D _{1E}	XP_006625630.1	D ₄	XP_006642527.1
				D _{4rs}	XP_006633286.1
Stickleback (Three-spined stickleback)	<i>Gasterosteus</i>	D _{1Aa}	G3Q397		
	<i>aculeatus</i>	D _{1Ab}	G3QBX5		
		D _{1Ba}	G3P395		
		D _{1Bb}	G3PUT1		
		D _{1Ca}	G3PAM4		
Tetraodon (Spotted green pufferfish)	<i>Tetraodon</i>			D _{2a}	H3CQR4
	<i>nigroviridis</i>			D ₃	H3D5B2
Turkey	<i>Meleagris</i>			D ₂	O73810
	<i>gallopavo</i>			D ₃	G1NND1
Turtle	<i>Chelonia mydas</i>	D _{1E}	XP_007068400.1		
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	D _{1Aa}	E7F359	D _{2a}	Q8AWE0
		D _{1Ab}	B6E506	D _{2b} (D _{2c})	Q7T1A1
		D _{1Bb}	XP_005159907.1	D _{2like} (D _{2b})	Q7T1A2

CHAPITRE II

D _{1Ca}	XP_005158584.1	D ₃	Q8AWE1
D _{1Cb}	F1QPK9	D _{4a}	NP_001012634.2
D _{1E}	A3KPR9	D _{4b} (D _{4c})	Q5DJ14
		D _{4rs} (D _{4b})	Q5DJ15

Xenopus	<i>Xenopus laevis</i>	D _{1A}	P42289	D ₂	P24628
		D _{1B}	P42290	D ₄	XP_002937535.2
		D _{1C}	P42291		

¹ Dopamine receptor names with parenthesis correspond to the name given in the original publication.

CHAPITRE II

Figure captions

Figure 1: Alignment of the two deduced pikeperch D_{1A} receptors with those of other vertebrates. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. Sequences were extracted from NCBI, Ensembl and UniProt with following sequence IDs: Human (*Homo sapiens*) D₁, P21728; Zebrafish (*Danio rerio*) D_{1Aa}, E7F359; Zebrafish D_{1Ab}, B6E506; Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) D_{1Aa}, XP_013127197; Nile tilapia D_{1Ab}, I3KZ49; European eel (*Anguilla Anguilla*) D_{1A1}, Q98841; European eel D_{1A2}, Q98842.

Figure 2: Alignment of the two deduced pikeperch D₂ receptors with those of other vertebrates. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. * indicates the 29 missing amino acids in the pikeperch D_{2S} sequences. Sequences were extracted from Ensembl and UniProt with following sequence IDs: Human (*Homo sapiens*) D_{2L}, P14416-1; Human D_{2S}, P14416-2; Zebrafish (*Danio rerio*) D_{2a}, Q8AWE0; Zebrafish D_{2b}, Q7T1A1; Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) D₂, Q5Y5R4; European eel (*Anguilla Anguilla*) D_{2A}, A1XYV7; European eel D_{2B}, A1XYV8

Figure 3: Consensus phylogenetic tree of vertebrate D₁ receptor family. This phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method using 1000 bootstrap replicates. The number above the branch represents the bootstrap value (%). Only values and branching above 50% are shown. The consensus tree was rooted on the human, *Homo sapiens*, adrenergic

CHAPITRE II

receptors. Red arrows indicate pikeperch sequences. Sequences used for this analyse are in Supplementary Table 3.

Figure 4: Consensus phylogenetic tree of vertebrate D₂ receptor family. This phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method using 1000 bootstrap replicates. The number above the branch represents the bootstrap value (%). Only values and branching above 50% are shown. The consensus tree was rooted on the human, *Homo sapiens*, adrenergic receptors. Red arrows indicate pikeperch sequences. Sequences used for this analyse are in Supplementary Table 3

Figure 5: Relative gene expression of (A) D_{1Aa} (B) D_{1Ab}, (C) D_{2like} (D_{2l}), (D) D₃ and (E) D₄-related sequence (D_{4rs}) in different pikeperch tissues. Data are normalized on the geometric mean of housekeeping genes AK and RPL8. OB, olfactory bulbs; Tel, Telencephalon (including the preoptic area); OT, Optic Tectum; Cb, Cerebellum; Hyp, Hypothalamus; SC, Spinal Cord; Pit, Pituitary; Gon, Gonads; L, Liver; H, Heart; Mu, Muscle; AT, Adipose Tissue; G, Gills; Spl, Spleen. Values are means \pm SEM. Different lowercase letters indicate significant differences between tissues.

Supplementary Figure 1: Alignment of the deduced pikeperch D_{1B} receptors with those of other vertebrates. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. Sequences were extracted from NCBI, Ensembl and UniProt with following sequence IDs: Human (*Homo sapiens*) D₅, P21918; Zebrafish (*Danio rerio*) D_{1Bb},

CHAPITRE II

XP_005159907.1; Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) D_{1Ba}, I3KYB9; Nile tilapia D_{1Bb}, XP_013131143; European eel (*Anguilla anguilla*) D_{1B}, Q98843.

Supplementary Figure 2: Alignment of the deduced pikeperch D_{1C} receptors with those of zebrafish, *Danio rerio*, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and European eel, *Anguilla anguilla*. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. Sequences were extracted from NCBI, Ensembl and UniProt with following sequence IDs: Zebrafish D_{1Ca}, XP_005158584.1; Zebrafish D_{1Cb}, F1QPK9; Nile tilapia D_{1Ca}, XP_005473811; Nile tilapia D_{1Cb}, XP_003449479; European eel D_{1C}, Q98844.

Supplementary Figure 3: Alignment of the deduced pikeperch D_{2like} (D_{2l}) receptor with those of zebrafish, *Danio rerio*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. Sequences were extracted from NCBI, Ensembl and UniProt with following sequence IDs: Zebrafish D_{2l}, Q7T1A2; Nile tilapia D_{2l}, XP_005455936.1.

Supplementary Figure 4: Alignment of the deduced pikeperch D₃ receptor with those of other vertebrates. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. Sequences were extracted from NCBI, Ensembl and UniProt with following

CHAPITRE II

sequence IDs: Human (*Homo sapiens*) D₃, P35462; Zebrafish D₃, Q8AWE1; Nile tilapia D₃, I3K990.

Supplementary Figure 5: Alignment of the deduced pikeperch D₄-related sequence (D_{4rs}) receptor with those of zebrafish, *Danio rerio*, and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The dark amino acids shared residues across all compared sequences. TMDs (Transmembrane Domains) are indicated with a horizontal line and numbered. Cytoplasmic loops are numbered. The DRY sequence and the conserved cysteine residue in the C-terminal tail are boxed. Sequences were extracted from NCBI, Ensembl and UniProt with following sequence IDs: Zebrafish D_{4rs}, Q5DJ15; Nile tilapia D_{4rs}, I3JL32.

Figure 1

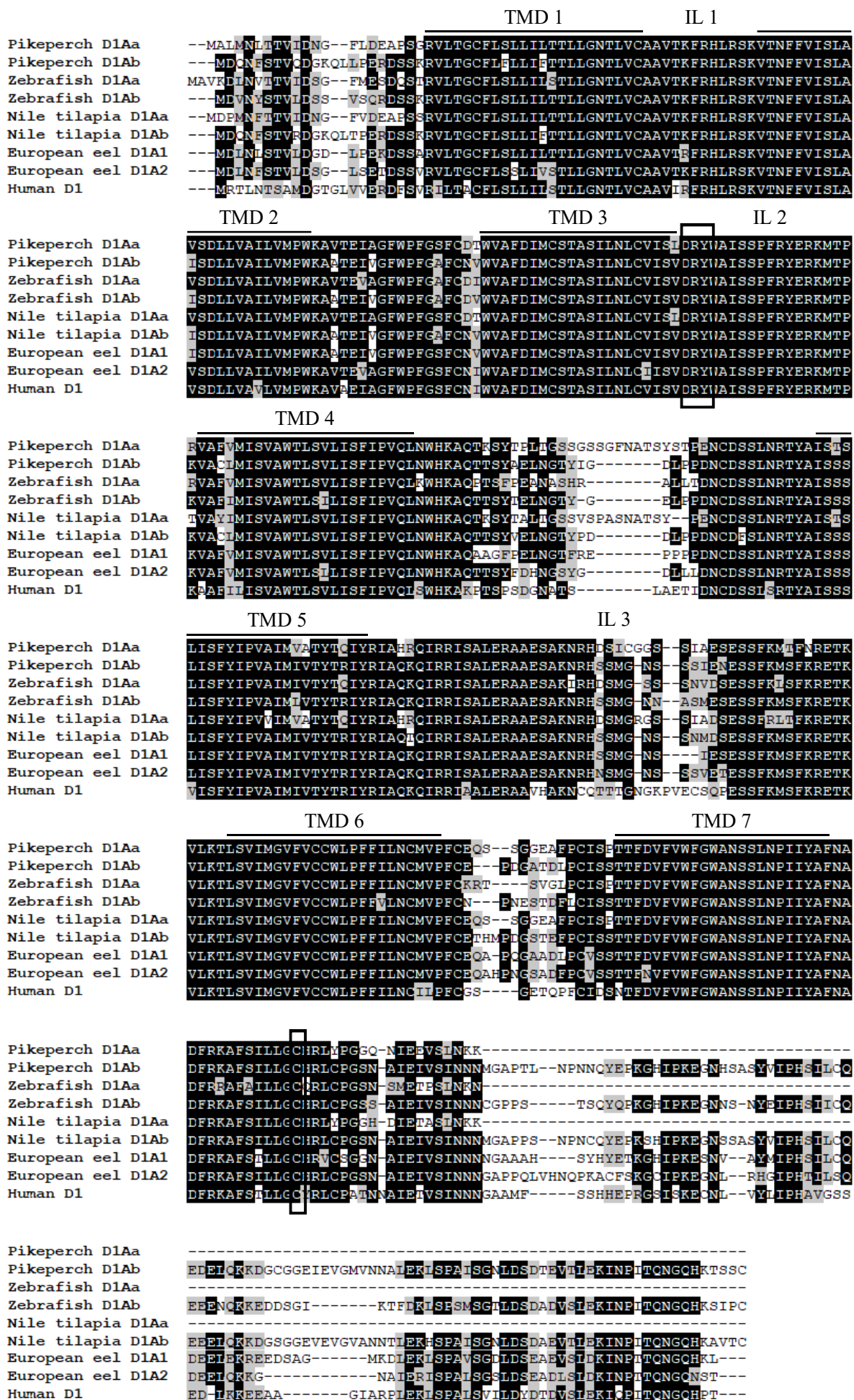


Figure 2

TMD 1 IL 1

Pikeperch D2L MDVFTQYAYNDSFN-DNGTWSFNQTDCEH-KHEYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCI AVSREKALQTTN
 Pikeperch D2S MDVFTQYAYNDSFN-DNGTWSFNQTDCEH-KHEYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCI AVSREKALQTTN
 Zebrafish D2a MEVFTQYAYNESFF-ENASRFNFQTEGG-RHCYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN
 Zebrafish D2b MDELTEYFYNDTYD-DNGTGFNQTSCFA-KHCYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN
 Nile tilapia D2 MDVFTQYAYNDSFY-DNGTWSFNQTDCEQ-KHEYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN
 European eel D2A MDYLTEYFYNETLY-ENATEGINTETERGQ-RHCYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN
 European eel D2B MDEFLAYAYNESYY-CNGTESANSTECFG-KHCYNYYAMLLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN
 Human D2L MDELNLSWYDDLERQNSRPFNFGSDGKADRPFYNYAALLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN
 Human D2S MDELNLSWYDDLERQNSRPFNFGSDGKADRPFYNYAALLTLLIFVIVFGNVLVCM AVSREKALQTTN

TMD 2 TMD 3

Pikeperch D2L YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 Pikeperch D2S YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 Zebrafish D2a YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 Zebrafish D2b YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 Nile tilapia D2 YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 European eel D2A YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 European eel D2B YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 Human D2L YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP
 Human D2S YLIVSLAVADLLVATLVMPWVVVYLEVVGWRF SKIHCDIFVTLDVMMCTASILNLC AISI DRYTAVAMP

IL 2 TMD 4 TMD 5

Pikeperch D2L LYNTRYSSRRRVTVMSVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 Pikeperch D2S LYNTRYSSRRRVTVMSVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 Zebrafish D2a LYNTRYSSKRRVTVMISVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 Zebrafish D2b LYNTRYSSKRRVTVMISVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 Nile tilapia D2 LYNTRYSSRRRVTVMSVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 European eel D2A LYNTRYSSKRRVTVMISVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 European eel D2B LYNTRYSSKRRVTVMISVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 Human D2L LYNTRYSSKRRVTVMISVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL
 Human D2S LYNTRYSSKRRVTVMISVWVLSFAISCP LLFGLNNTATRDSLCVIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLL

*

Pikeperch D2L VYVQIYVVLRRRRKRVNTKPKQRVQCDFEDVATSLKDKCTHPEDVRLCTIVKKSNGSFFVNNKRVIFIK
 Pikeperch D2S VYVQIYVVLRRRRKRVNTKPKQRVQCDFEDVATSLK-----IFIK
 Zebrafish D2a VYVQIYVVLRRRRKRVNTK---RTCPVTDVMSSTIK-KCTHEDVRLCTIVKKSNGSFFVNNKRVIFIK
 Zebrafish D2b VYVQIYVVLRRRRKRVNTK---RSCQKTDPAQPFLLKDKCTHPEDVRLCTIVKKSNGSFFVNNKRVIFIK
 Nile tilapia D2 VYVQIYVVLRRRRKRVNTKPKQRVQAADFDVATSLKDKCTHPEDVRLCTIVKKSNGSFFVNNKRVIFIK
 European eel D2A VYVQIYVVLRRRRKRVNTK---RTFHGFDSDANATLKGCTHPEDVRLCTIVKKSNGSFFVSRKRVIFIQ
 European eel D2B VYVQIYVVLRRRRKRVNTK---RSTRRTDPAAT---KCKCTHPEDVRLCTIVKKSNGSFFLKNKRVIFIQ
 Human D2L VYIKIYIVLRRRRKRVNTK---RSSRAFRHLRAFLKGNCTHPEDVRLCTIVKKSNGSFFVNNRRV----
 Human D2S VYIKIYIVLRRRRKRVNTK---RSSRAFRHLRAFLK-----

IL 3

Pikeperch D2L DVVNBGEDLELDSINNSGSSCKKQCPQCALGDTPATSHQLLMBNKANASPTSTPFPFQERCKPEKNG
 Pikeperch D2S DVVNBGEDLELDSINNSGSSCKKQCPQCALGDTPATSHQLLMBNKANASPTSTPFPFQERCKPEKNG
 Zebrafish D2a EVVNNGDDIQMDEITNRNPSRQKQDQSGGSSQON---SRLV---N-SNLRETDISPSP-EAGVKPEKNG
 Zebrafish D2b EVLHCGEDVGMEMVAGTSPPEKRLKASSLVVD-----LLATFSPNHGS-----PSHAEQSNGDEKNG
 Nile tilapia D2 DVVNBGEDLELDSINNSGSSCKKQCIQCALGDTPATSHQLLMBNKRASASPTSTPFPFQERCKPEKNG
 European eel D2A EVVQRCEDMELDVRAGANPEERKPAPTSSAS-----PILCMPEPPDPOGLAPPSVDESPLKPEKNG
 European eel D2B EAVQHSNHMELDMSSNSPLEKRLAPAAAS-G-----QHLCTPSSNPOGSSAPPSVAVS-RANSNG
 Human D2L EAARRACELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPS-----HHQLTLEDPSHHG-----LHSTPDSPAKPEKNG
 Human D2S EAARRACELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPS-----HHQLTLEDPSHHG-----LHSTPDSPAKPEKNG

TMD 6

Pikeperch D2L DPTKEAPGDPAPIVAKAFCTQALPNGKTCISV-KTMSKRRISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 Pikeperch D2S DPTKEAPGDPAPIVAKAFCTQALPNGKTCISV-KTMSKRRISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 Zebrafish D2a NTS-----SIKGAKAFETQALPNGKTCISV-KTLNKRKISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 Zebrafish D2b HAK----DVQSPKTKFVETQALPNGKTCISV-KTMSKRRISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 Nile tilapia D2 DPASET LGNPPPIVAKAFCTQALPNGKTCISV-KTMSKRRISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 European eel D2A HAK----EGREFRIAKAFETQALPNGKTCISV-KTLNKRKISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 European eel D2B HAR----DADPKTGKAFETQALPNGKTCISV-KTLNKRKISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 Human D2L HAK-----DEPKIAKIFETQALPNGKTCISV-KTMSKRRISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT
 Human D2S HAK-----DEPKIAKIFETQALPNGKTCISV-KTMSKRRISQOKEKKATQMLAIVLGVFIICWLPFFIT

TMD 7

Pikeperch D2L HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 Pikeperch D2S HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 Zebrafish D2a HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 Zebrafish D2b HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 Nile tilapia D2 HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 European eel D2A HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 European eel D2B HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 Human D2L HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC
 Human D2S HILNTHCTKCKVPEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTTFNVEFRKAFIKILHC

Figure 3

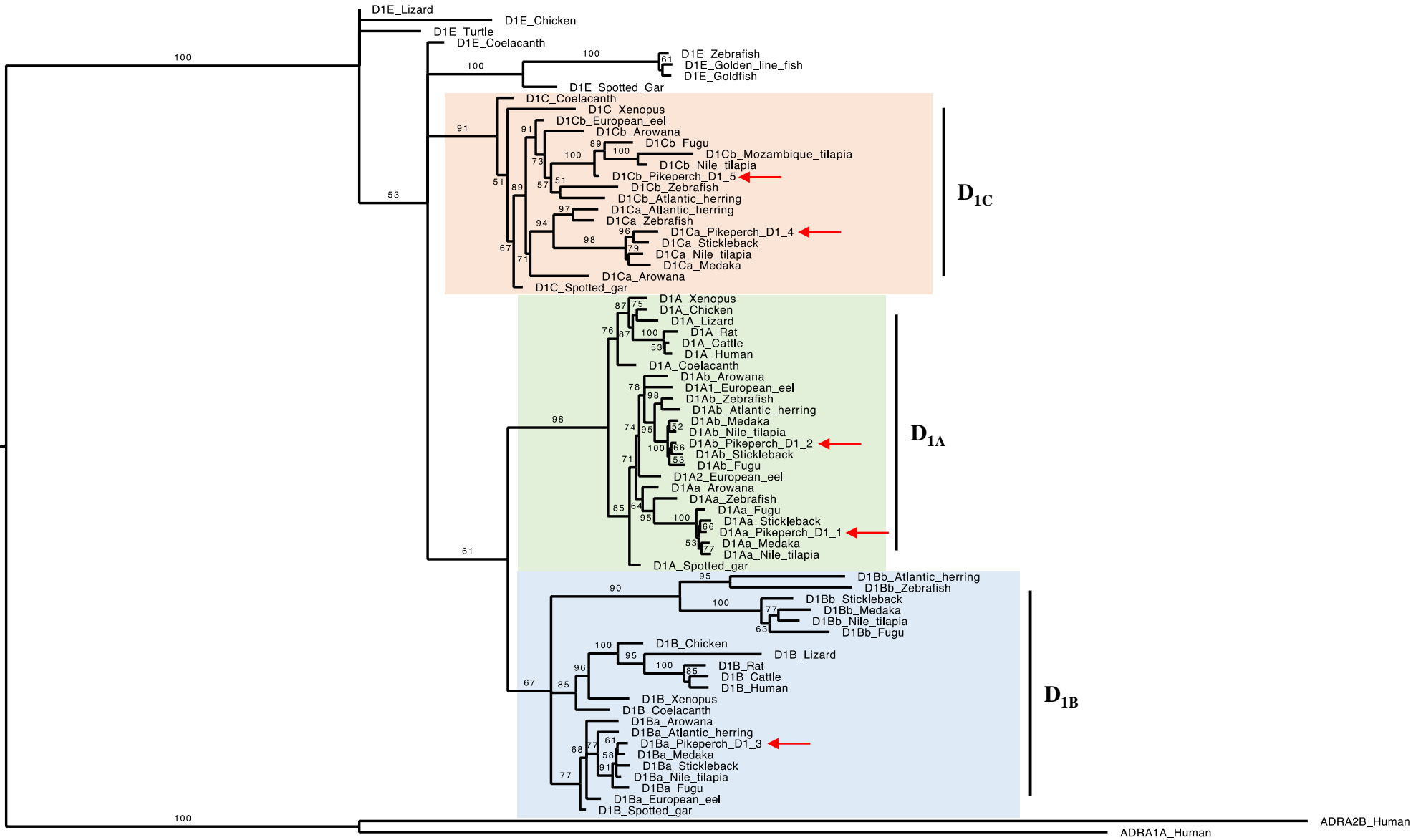


Figure 4

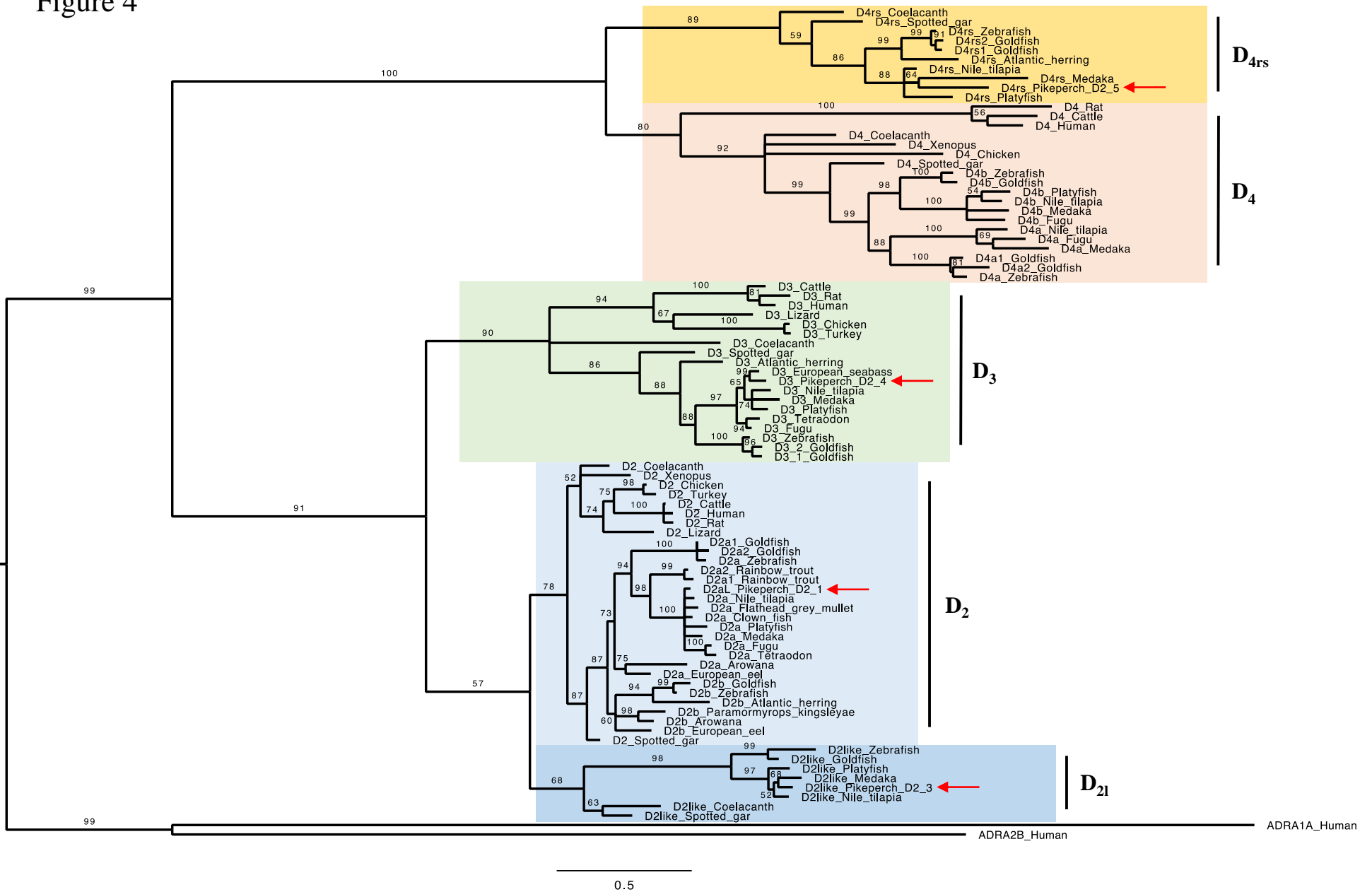
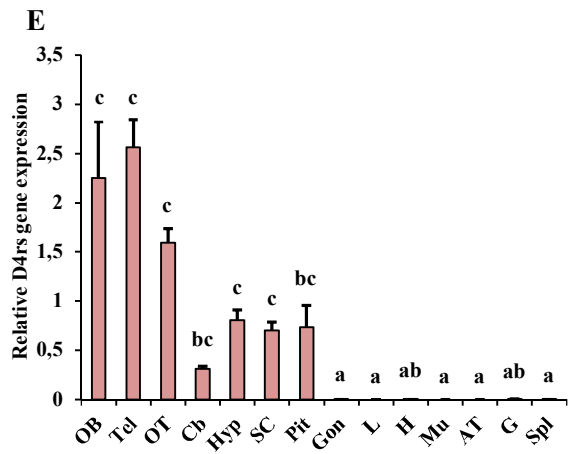
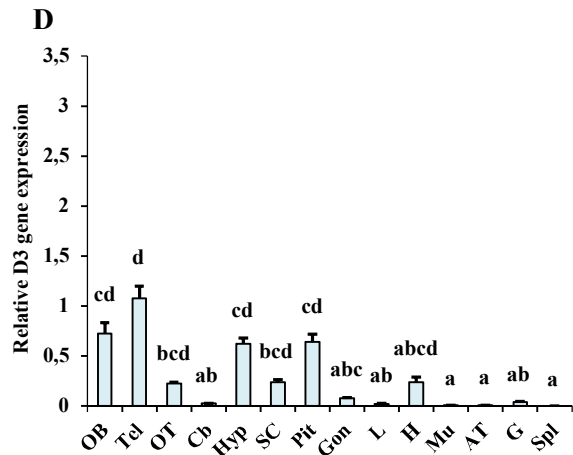
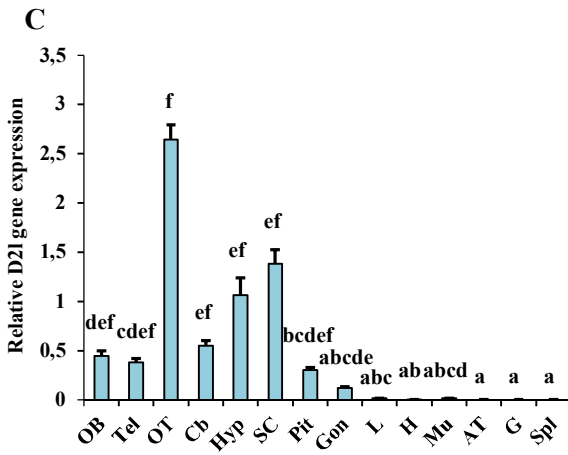
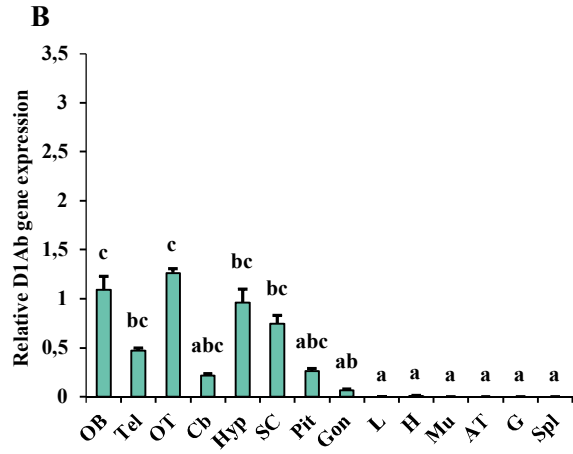
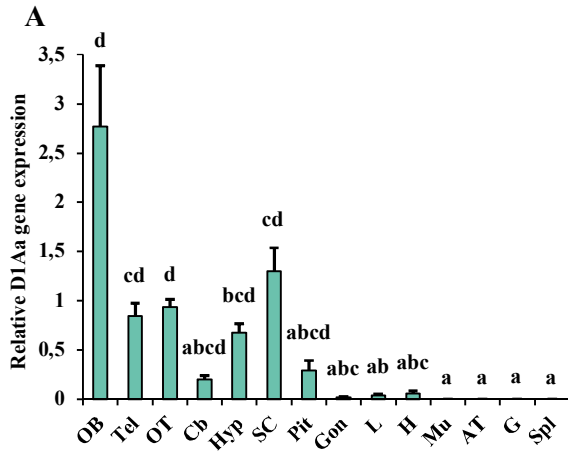
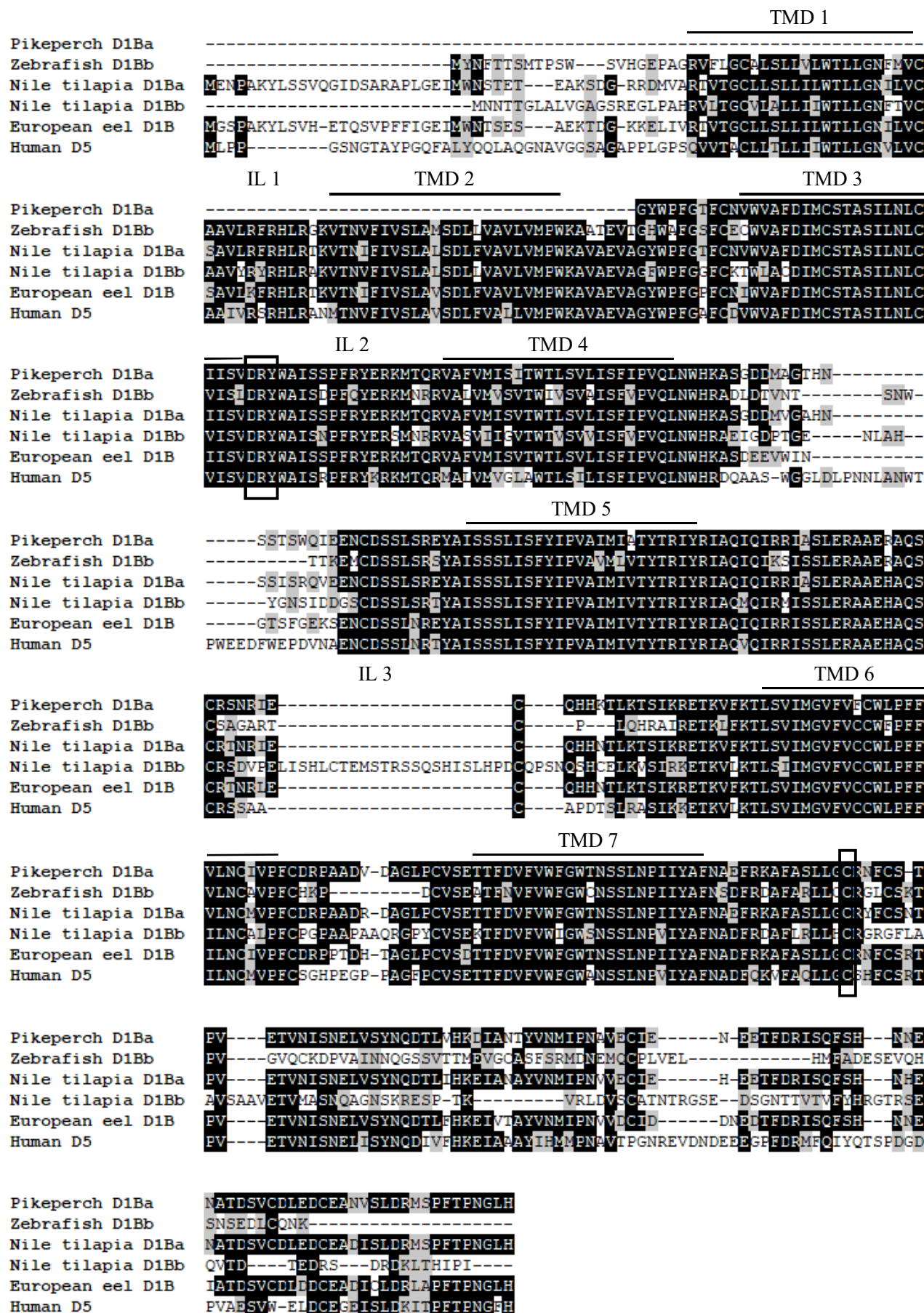


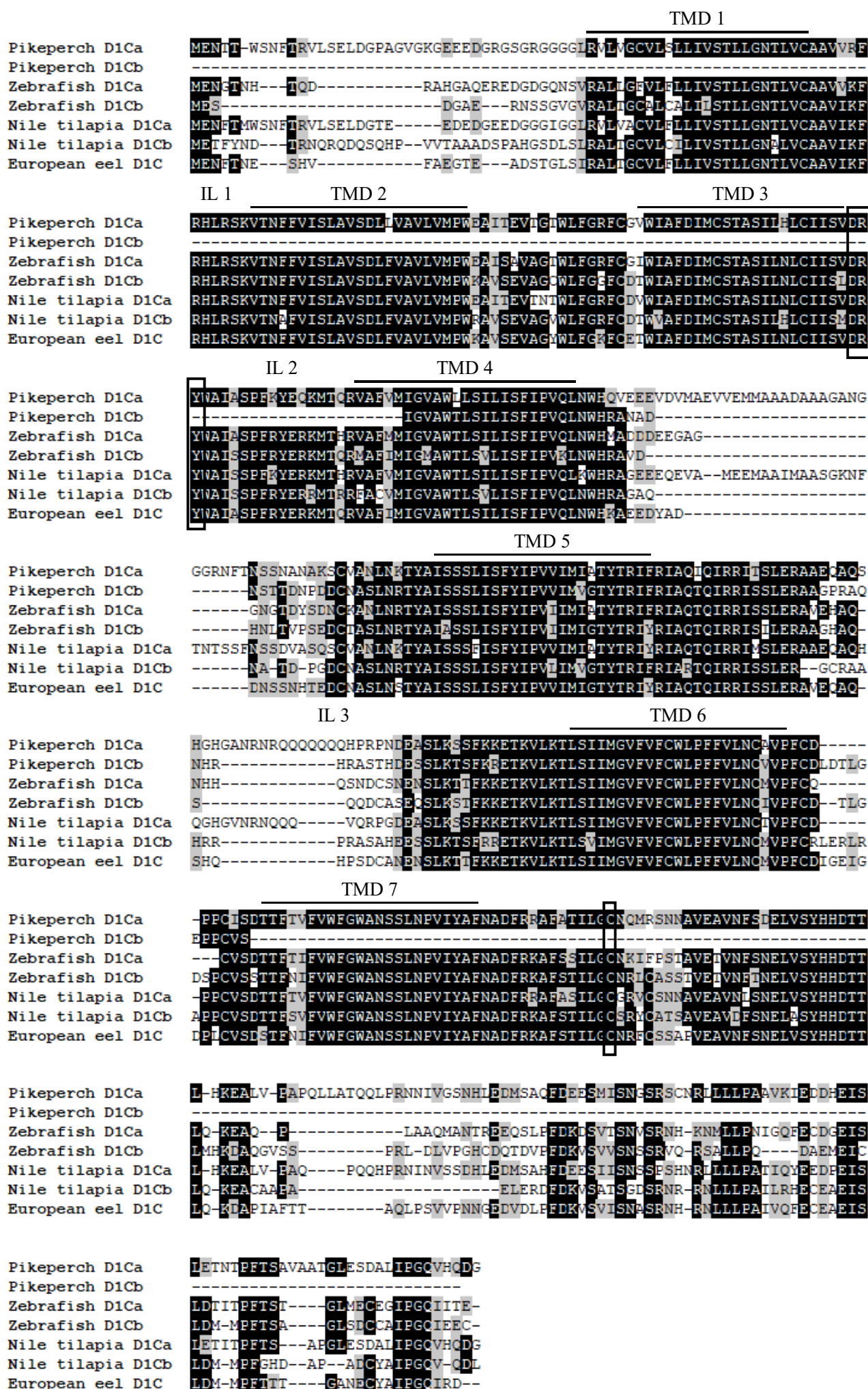
Figure 5



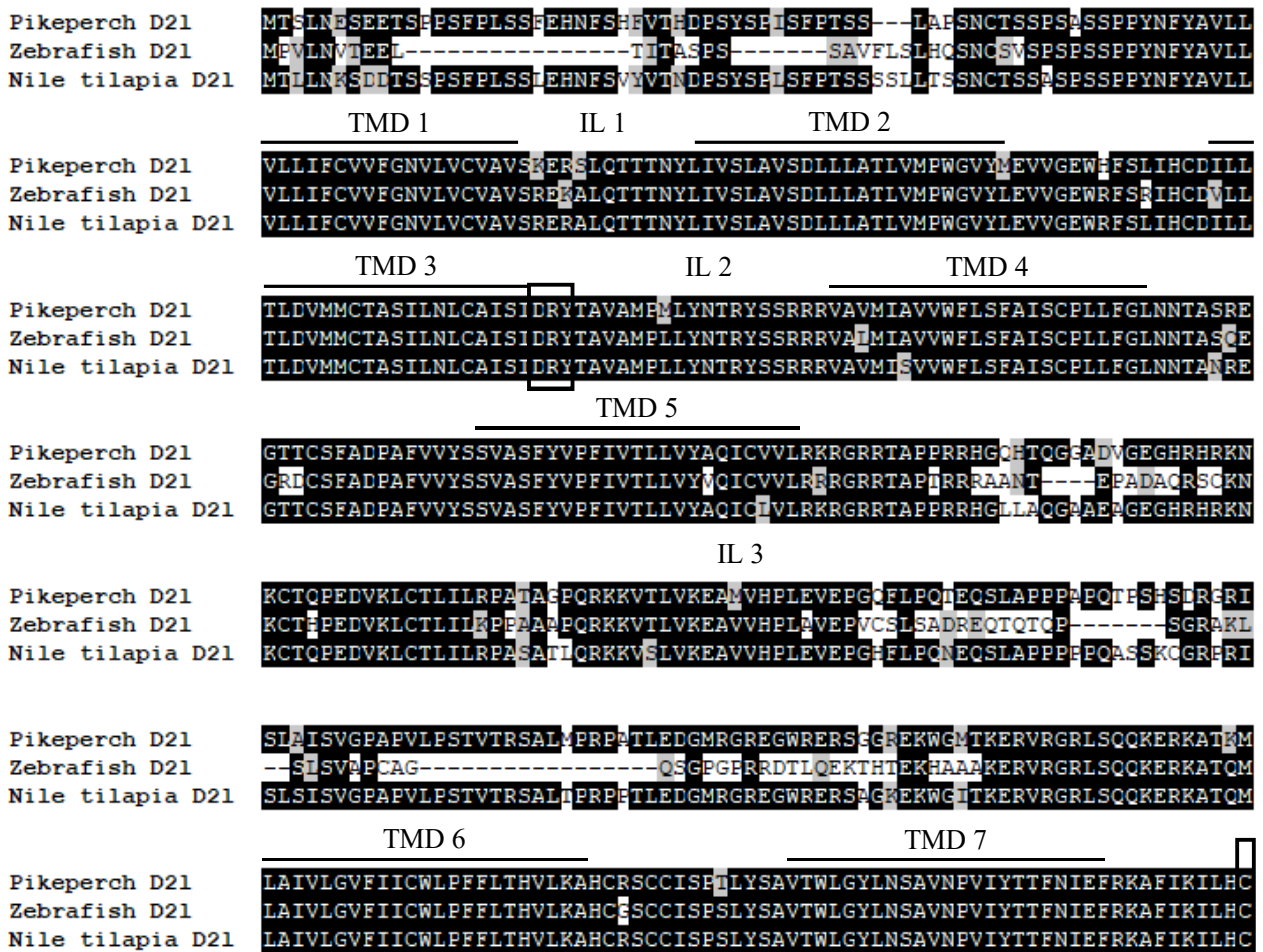
Supplementary Figure 1



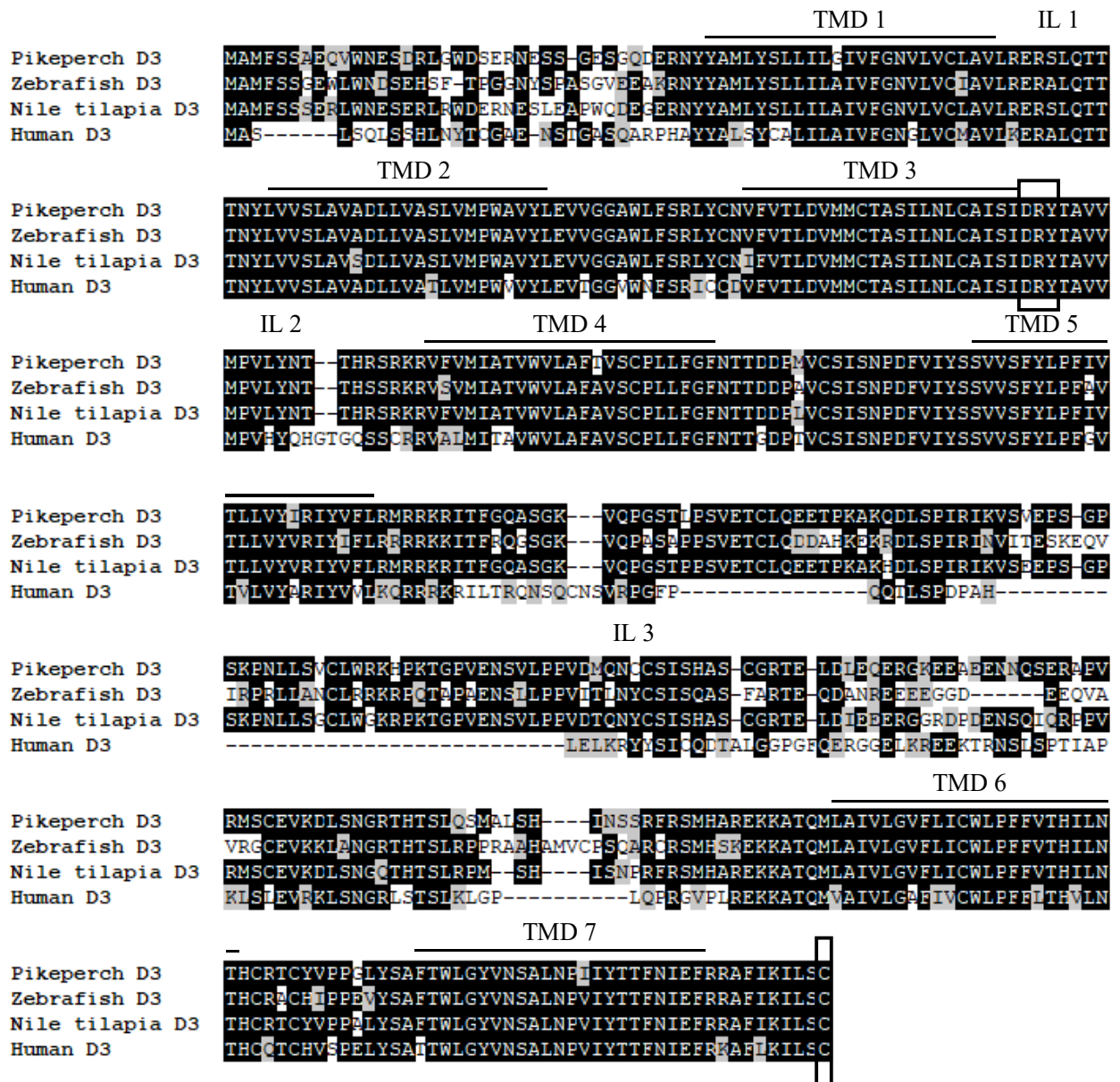
Supplementary Figure 2



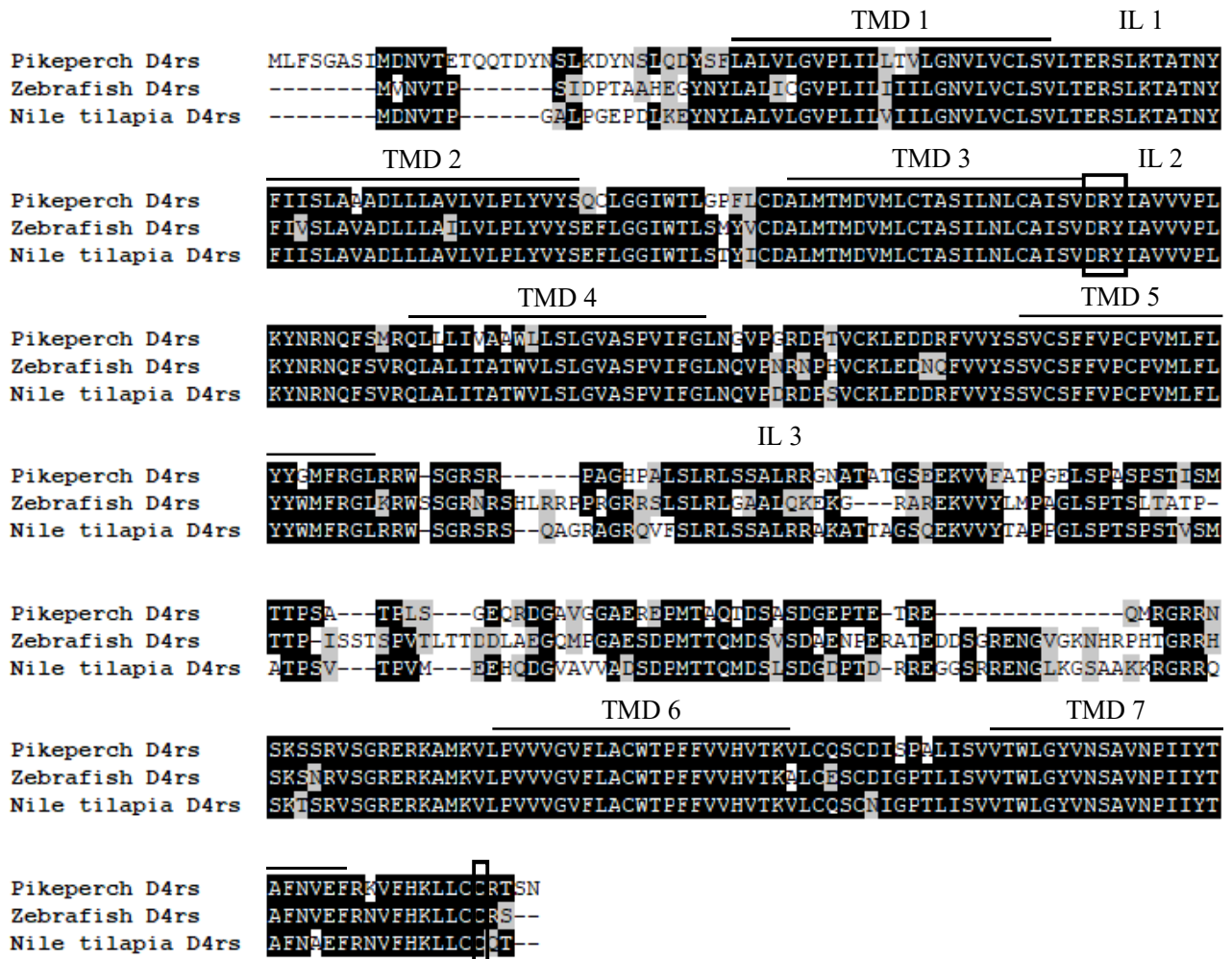
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



**CONTEXTE DU
CHAPITRE III**

CONTEXTE DU CHAPITRE III

La problématique de ce deuxième chapitre reposait sur l'absence d'informations sur les mécanismes d'action du système dopaminergique dans la régulation des stéroïdes sexuels et plus exactement sur l'existence, le nombre et la distribution des récepteurs de la dopamine chez le sandre lors des phases finales de l'ovogenèse.

Pour répondre à cette problématique, nous avons effectué une analyse du transcriptome cérébral en cours de maturation méiotique ovocytaire afin de répertorier l'ensemble des récepteurs dopaminergiques chez le sandre. Nous avons également étudié les niveaux d'expression tissulaires de gènes de certains récepteurs (cerveau, hypophyse, ovaires et autres tissus périphériques). Nous avons non seulement montré que les deux familles de récepteurs existent chez le sandre, qu'elles possèdent plusieurs sous-types de récepteurs pouvant être codés par plusieurs gènes, mais également que des isoformes issues de l'épissage alternatif des ARNm des récepteurs D₂ (D_{2aS} et D_{2aL}) existent. De plus, nous avons montré que l'ensemble des gènes des récepteurs étudiés (familles D₁ et D₂) sont aussi exprimés dans l'hypophyse et l'ovaire suggérant une implication directe du système dopaminergique aux différents niveaux de l'axe gonadotrope.

Chez le sandre, une grande complexité dans l'organisation des récepteurs de la dopamine est mise en évidence. L'expression des gènes de certains de ces récepteurs aux niveaux cérébral, hypophysaire et ovarien suggère une implication directe du système dopaminergique aux différents niveaux de l'axe gonadotrope lors des phases finales de l'ovogenèse.

Malgré l'identification des récepteurs et la détermination de leur profil d'expression tissulaire, leurs mécanismes régulateurs de l'axe gonadotrope, et notamment de la stéroïdogenèse (*Cf. Chapitre I*) restent encore obscurs. Par exemple, nous ne savons pas si cette action du système dopaminergique observée *in vivo* passe uniquement par le cerveau ou si elle a lieu aussi dans l'ovaire. La mise en culture de chacun de ces organes permettrait d'investiguer cette action directe et locale de la dopamine et de ses récepteurs sur les hormones de l'axe gonadotrope (GnRH, LH et stéroïdes sexuels) en supprimant tout effet dû à un mécanisme biologique externe. Cette méthode *in vitro* pourrait aussi permettre de confirmer et d'affiner notre compréhension du rôle des récepteurs D₁ dans la reproduction du sandre lors des phases finales de la gamétogenèse.

CHAPITRE III

CHAPITRE III

***In vitro*, both D₁ and D₂ dopamine receptor families are involved in the up-regulation of sex-steroid production from pikeperch ovary during the final oocyte maturation**

Jennifer Roche^a, Imen Ben-Ammar^{a,1}, Amandine Depp^a, Marie Schmitt^a, Sébastien Hergalant^b,
Tomas Policar^c, Pascal Fontaine^a and Sylvain Milla^a

^a Université de Lorraine, INRA, UR AFPA, F-54000 Nancy

^b INSERM U1256, Université de Lorraine, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy

^c South Bohemian Research Centre of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia, 38 925 Vodnany, Czech Republic

¹ Present address: Université de Namur, URBE, 5000 Belgium

Corresponding author: Sylvain Milla. Email: sylvain.milla@univ-lorraine.fr

CHAPITRE III

Abstract

Pikeperch, *Sander lucioperca*, is a species of interest for aquaculture diversification whose hormonal control of the final oocyte meiotic maturation and ovulation remains unclear. In many teleost species, dopamine (DA) inhibits these events of the pre-ovulatory period through the inhibition of the basal or the GnRH-stimulated LH release directly in the pituitary. However, not only the existence and the potency of the dopaminergic inhibition are contradictory in teleosts notably in perciforms, but the direct and local regulatory mechanisms of DA and its receptors in brain and ovary led to conflicting results. To address this question, brain and ovary from maturing female pikeperch were sampled and incubated *in vitro* for 8h under different treatments: (1) culture medium without molecules added (negative control), (2) 0.1, 1 or 10 μM of DA, (3) 0.5, 5 or 50 μM of a D₁ DA receptor antagonist SCH23390 (SCH), (4) 0.5, 5 or 50 μM of a D₂ DA receptor antagonist metoclopramide (MCP), (5) 0.1, 1 or 10 μM of DA associated with 0.5, 5 or 50 μM of SCH, respectively or (6) with 0.5, 5 or 50 μM of MCP, respectively. The culture medium was sampled at 0, 4 and 8h of incubation for further T, E₂ and DHP analysis while brains were sampled after 8h for further GnRH-3 and LH β gene expression analysis. Although only the ovarian T production was increased by DA (10 μM), both DA receptor families were involved in the T and E₂ up-regulation at the ovarian level. On the contrary, only the D₂ receptor family was involved in the regulation of the brain GnRH-3 mRNA levels. The brain LH β gene expression and ovarian DHP production were not regulated by the dopaminergic system. This study is the first to report the involvement of both DA receptor families in the regulation of sex-steroid production at the ovarian level in pikeperch.

Keywords: pikeperch, dopamine, receptors, sex-steroids, *in vitro* organ culture

CHAPITRE III

1. Introduction

Over the last few years, pikeperch, *Sander lucioperca*, has become a worthy teleost species for the aquaculture diversification especially thanks to its flesh quality and its recreational value (Kestemont et al., 2015). Despite an increase of its inland aquaculture production these last years, pikeperch captures have highly declined but still remain the main supply of the increasing market demand (FAO, 2017). In the objective to respond to consumer's demand, important efforts have been deployed to develop pikeperch aquaculture. For instance, the control of the reproductive cycle has been investigated in order to efficiently induce the final oocyte meiotic maturation (FOM) and the ovulation, one of the main reproductive critical steps in teleosts (Mañanós et al., 2008).

In fish females, the FOM and the ovulatory process are regulated by the brain-pituitary-gonads axis. Its activation generates the successive production of GnRHs, LH and sex-steroid hormones (androgens, progestagens or corticosteroids) that trigger these oocyte events (Lubzens et al., 2010). In many teleosts, dopamine (DA) regulates the induction of the ovulation through the inhibition of the basal or the GnRH-stimulated LH release (Yaron and Levavi-Sivan, 2011). This dopaminergic inhibitory tone at the pre-ovulatory period is highly species-dependent. It is strong in some cyprinids, silurids, salmonids and also in some perciforms such as tilapia, *Oreochromis spp*, in which DA totally blocks the ovulation step (Mañanós et al., 2008; Dufour et al., 2010). On the contrary, this DA inhibition is very weak or absent in other perciform species such as the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (Copeland and Thomas, 1989) and the Gilthead seabream, *Sparus aurata* (Dufour et al., 2010).

In vertebrates, the DA actions are mediated through the binding to membrane receptors split into two distinct families, respectively called the D₁ and the D₂ (Yamamoto et al., 2015). The DA responsible for the LH inhibition originates from the preoptic area and directly acts to the

CHAPITRE III

pituitary region containing gonadotrope cells (Kah et al., 1984, 1987) through the D₂ receptor family (Dufour et al., 2010; Fontaine et al., 2013). To date, a wide range of investigations of the DA actions has been performed in the pituitary and has led to the conclusion that the D₂ receptors are the main mediators of the DA action (Chang et al., 1990; Yu and Peter, 1992; Levavi-Sivan et al., 1995; Melamed et al., 1996; Van Goor et al., 1998; Vacher et al., 2002; Dufour et al., 2010; Wang et al., 2011; Jolly et al., 2016). On the contrary, only few studies dealt with this regulation in the brain. In goldfish, Yu et al. (1991) showed that DA decreases GnRH release from the preoptic-anterior hypothalamic region. However, there is contradictory data about the receptor family involved in this regulation. On the one hand, using *in vitro* biological test, Bryant et al. (2016) demonstrated that DA inhibits directly GnRH neurons in the hypothalamus through the D₂ receptors in the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. On the other hand, using DA receptors agonists and antagonists, Yu and Peter (1992) showed that DA inhibits the spontaneous GnRH release in the preoptic area slices through the D₁, but not through the D₂ receptors family. However, in this study, no DA receptor (D₁ and D₂) antagonists were able to block the DA-induced inhibition GnRH release that makes the question of this DA regulation in brain more confused. In the Philippine catfish, *Clarias batrachus*, by using two DA receptor agonists, SKF-38393 (D₁) and quinpirole (D₂), Singh et al. (2012) suggested that the inhibition of LH production in the pituitary is positively regulated by brain D₁ receptors and negatively by D₂ receptors through modulation of neuronal isotocin. Thus, these results indicated that both receptor families would be involved in the DA regulation of GnRH-LH axis in the brain. Alternatively to this GnRH-LH system regulation, some authors suggested that DA would also be directly involved in the steroidogenesis regulation, either in the brain (Xing et al., 2016) or in the gonads (Chaube et al., 2014) through D₁ or D₂ receptors. Indeed, Xing et al. (2016) showed, by using an *in vitro* radial glial cells culture from pre-spawning goldfish

CHAPITRE III

hypothalamus and telencephalon, that the activation of the D₁ receptors with SKF38393 up-regulates the aromatase B gene expression, which can be enhanced by low E₂ concentrations. Using *in vitro* ovarian slices in gravid catfish, *Heteropneustes fossilis*, during the spawning phase, Chaube et al. (2014) demonstrated that a D₂ receptors antagonist (domperidone) in association with a GnRH analogue decreased T and E₂ levels and increased the DHP release, the supposed MIS in this species, suggesting a direct role of DA through D₂ receptors in ovaries in the induction of FOM and ovulation. However, using an *in vivo* study in pikeperch, we showed that the injection of a D₁ receptor antagonist (SCH23390, SCH) in association with a GnRH analogue increased the T and E₂ secretion in plasma during the pre-ovulatory period, whereas no effect was observed with the metoclopramide (MCP) as D₂ receptors antagonist (Roche et al., 2018). This *in vivo* study strengthens the results of Xing et al. (2016) about the sex-steroid regulation through D₁ receptors but does not support the data of Chaube et al. (2014) regarding the involvement of D₂ in the ovarian steroidogenic regulation. Furthermore, this *in vivo* experiment does not allow to clarify the location of this effect along the gonadotropic axis (brain or ovary). In addition, the involvement of the D₂ receptors on steroidogenesis regulation should not be totally excluded in pikeperch. Indeed, the gene expression profile of DA receptors in maturing female pikeperch showed that both receptors families are expressed in the brain but also in the ovary (Roche et al, unpublished data), raising the hypothesis of their direct involvement in the regulation of the sex-steroids in both organs. By the way, DA effects on ovarian steroidogenic regulations have been poorly investigated so far in teleost species and need to be further developed.

In summary, information is unclear about presence of the dopaminergic inhibition during FOM in perciforms, about the targeted reproductive hormones (GnRH, LH or sex-steroids) and about the type of DA receptors involved (D₁ or D₂ family) in these regulations. In particular, the direct

CHAPITRE III

and local regulatory mechanisms of DA and its receptors in brain and ovary have also led to conflicting results in teleosts. Thus, we aimed to investigate the *in vitro* effects of DA and of the two DA receptors antagonists, SCH and MCP on the brain GnRH-3 and LH β gene expression and on the ovarian sex-steroid production (E₂, T and DHP).

2. Materials & Methods

2.1. Animal and sampling procedures

Mature pikeperch females (n = 48; 3-4 years old; 1.07 \pm 0.04 kg) from Czech Republic (origin: production pond Bynovsky, Fishery Nove Hradky Ltd) were checked for FOM stages according to the classification made by Źarski et al. (2012). Briefly, oocytes were sampled using a catheter (CH06; 1.2 mm internal and 2 mm external diameter) and placed in Serra's solution (ethanol/formalin/glacial acetic acid, 6:3:1 v/v/v). After mixing slowly oocytes in Serra's solution and waiting (about 5 min) until the cytoplasm of the oocytes become clarified, the oocyte maturation stage was evaluated under binocular microscope, magnification \times 4 (Motic® SFC-11 Series, Motic Asia, Hong Kong, China). In pikeperch, the FOM and the ovulation are divided into seven morphological stages, from stage I to stage VII (ovulation). On average, the females were evaluated between the stages I-II. Then, they were killed by overexposure to anaesthesia MS-222 (240 mg/L; Sigma-Aldrich, Lyon, France) and quickly sampled for whole brain and gonads.

2.2. *In vitro* brain and gonad culture

Two pieces of gonads (about 400 mg each one) and the brain separated into two hemispheres were washed thrice in Hanks' balanced salt solution (HBSS, Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with hepes (25mM, Sigma-Aldrich), bovine serum albumin (0.1%, Sigma-

CHAPITRE III

Aldrich), ascorbic acid (50 μ M, Sigma-Aldrich) and bacitracin (50 μ M, Sigma-Aldrich) for 10 min in 12-well culture plates under gentle agitation at 13°C. Then, tissues were incubated for 8h in supplemented medium containing one of the following treatments: (1) DA (0.1, 1 or 10 μ M; Sigma-Aldrich), (2) a D₁ DA receptor antagonist SCH (0.5, 5 or 50 μ M; Abcam, Paris, France), (3) a D₂ DA receptor antagonist MCP (0.5, 5 or 50 μ M, Sigma-Aldrich), 4) one dose of DA (0.1, 1 or 10 μ M) associated with one gradual dose of SCH (0.5, 5 or 50 μ M, respectively), (5) one dose of DA (0.1, 1 or 10 μ M) associated with one gradual dose of MCP (0.5, 5 or 50 μ M, respectively). DA and DA receptor antagonists were prepared in the culture medium and medium without molecules added was used as negative control. For each treatment and dose, six hemi-brains or pieces of gonads were used. Before the 8h- incubation period, each tissue was pre-incubated (30 min) with medium without molecules (for negative control and DA groups) or with DA receptor antagonist alone (the other groups). The culture medium was replaced after pre-incubation (0 h) and after 4h and stored at -80°C. After 8h, the culture medium and tissues were stored at -80°C for further steroid and gene expression analysis, respectively. The DA doses were chosen to be consistent with the literature (Yu et al., 1991; Yu and Peter, 1992; Bryant et al., 2016) and to respect a 10-fold factor between them. Each dose of antagonist was chosen to be in excess with respect to the DA dose (five-fold higher).

2.3. Gene expression analysis

2.3.1. Total RNA extraction and reverse transcription

Total RNA from hemi-brains was extracted using Trizol reagent (VWR International SAS, Strasbourg, France) according to the manufacturer's protocol and quantified using a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). After a Dnase treatment performed according to the manufacturer's procedure (Fisher Scientific), the

CHAPITRE III

reverse transcription (RT) was performed using 1 µg/µL of total RNA according to the following procedure: RNA was incubated in 20 µL of a RT reaction mixture: 2 µL of RT buffer (10X; Sigma-aldricht), 1 µL of dNTPs (10 mM; Sigma-aldricht), 1 µL of random nonamers (500 µg/µL; Sigma-aldricht), 0.5 µL of ribonuclease inhibitor (40 U/µL; Thermo scientific, Illkirch, France), 1µL of MMLV (Murine Moloney Leucemia Virus) reverse transcriptase (200 U/µL; Sigma-aldricht) and 13.5 µL of RNase-free water (VWR International SAS). Briefly, RNA, random nonamers and dNTPs were denatured for 10 min at 70°C. Then, the reverse transcription was performed at 37°C for 50 min. Reverse transcriptase was inactivated by heating samples at 90°C for 10 min. Reverse transcription products (cDNAs) were then stored at -80°C until real-time PCR analysis.

2.3.2. Real-time PCR

Real-time polymerase chain reaction (Q-PCR) was performed using a StepOne Plus system (Applied Biosystems, Fisher Scientific). cDNAs were diluted 1:20 and 5µL were used for each Q-PCR reaction. Each Q-PCR analysis was performed in duplicate using a SYBR Green PCR Master Mix (VWR International S.A.S.) in a total volume of 20 µL per Q-PCR well and using 600 nmol/L of primers. After a 10 min incubation step at 95°C, 40 cycles of PCR were performed. Amplification parameters were as follows: each cycle consisted in denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Ct (Cycle threshold) values correspond to the number of cycles at which the fluorescent signal monitored in real-time is detected above the threshold. A standard curve was generated using serial dilutions of a pool of reverse transcribed RNA from brain samples of all fish. This curve was used to calculate, using the StepOne software, the relative abundance of target cDNA within analyzed samples and the PCR efficiency. After the initial PCR program, a melting curve was realized using the following

CHAPITRE III

protocol: 15 s holding followed by a 0.3°C increase from 60°C to 95°C in order to check that a single PCR product was generated. To validate the specificity of the amplification and the absence of amplified genomic DNA, different controls were performed: 1) RNA sample without DNase treatment, 2) RNA sample without reverse transcriptase and 3) negative controls with RNase-free water instead of cDNA sample. The gene expression was normalized using the geometric mean of two housekeeping genes, Actin b (Actb) and RPL8 whose the expression was stable under these treatments (data not shown). LH and RPL8 primers were extracted from the works of Hermelink et al. (2011). To ensure that primers of Actb and GnRH-3 were specific of each gene, they were checked for uniqueness and pair concordance within each pikeperch transcriptome available in our laboratory (Roche et al., unpublished) using blastn with – word size 7 as parameter for small sequence matches. Primers used for the study are shown Table 1.

2.4. Levels of sex-steroid hormones in culture medium

After 0 h, 4 h and 8 h of incubation, sex-steroid hormones E₂, T and DHP were measured in culture medium using commercially available ELISA kits. The kits for E₂ (KAP0621) and T (KAPD1559) were obtained from Diasource (Louvain-La-Neuve, Belgium) and the kit for DHP (MBS2602842) from MyBiosource (San Diego, CA, USA). The sensitivity limit, and the intra- and interassay CV were, respectively, 0.005 ng/mL (range: 0 to 0.935 ng/mL), < 7% and < 9% for E₂; 0.083 ng/mL (range: 0 to 16 ng/mL), < 3% and < 12% for T; and 0.06 ng/mL (range: 0.312 to 20 ng/mL), < 8% and < 10% for DHP.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the free software R version 3.4.0. For all dependent variables, homogeneity of variances was tested using Levene test (leveneTest, package ‘car’,

CHAPITRE III

Fox and Weisberg, 2011).

Data were analysed by a linear mixed model (lmer, package 'lme4', Bates et al., 2015) with treatments as fixed effects, and either the fish (for repeated measures) and/or the maturation stage at the sampling time as random effects:

model=lmer($Y \sim \text{tissues} + (1|\text{fish}) + (1|\text{maturation_stage})$) with Y : dependent variable. Random effect that explains less than 15% of the total variability observed was eliminated. For model validation, residuals were tested for homogeneity and normality using residual vs fitted value and sample vs theoretical quantile (Q-Q) plots, respectively (plotresid, package 'RVAideMemoire', Hervé, 2016). If necessary, data were log transformed, root square transformed or reverse transformed. When the model was validated, an anova table was performed to calculate F-tests (anova, package 'car', Fox and Weisberg, 2011) followed by a Least-squares means (predicted marginal means) multiple comparison between treatments as post-hoc test (lsmeans, package 'lsmeans', Lenth, 2016) for the comparison negative control versus three doses of DA, MCP or SCH. For the comparisons of two treatment groups such as antagonist alone versus antagonist + DA or DA alone versus DA + antagonist, a student test (t.test) for independent or paired samples was performed.

When data, even transformed, did not meet the assumptions for the parametric tests, we used the kruskal-wallis test for nonparametric analysis with n variable (kruskal.test) followed by a pairwise comparison using Dunn test (posthoc.kruskal.dunn.test, package 'PMCMR', Pohlert, 2016) with Benjamini & Hochberg correction (BH, Benjamini and Hochberg, 1995) and a Mann-Whitney or a wilcoxon test (for independent or paired variables, wilcox.test). Data are expressed as mean \pm SEM. The level of significance used in all tests was $P < 0.05$.

CHAPITRE III

3. Results

We investigated the effects of i) different doses of DA, of ii) the DA receptor antagonists, SCH and MCP alone and of iii) their association with DA on the brain GnRH-3 and LH β gene expression and on the ovarian sex-steroid (T, E₂ and DHP) production in pikeperch.

3.1. Regulation of GnRH-3 and LH β gene expression in brain

No treatment induced significant difference in GnRH-3 mRNA levels compared with negative control (Figures 1a, b and c). However, DA at 1 μ M decreased these levels relatively to the results obtained with DA at 0.1 μ M ($P = 0.0417$, Figure 1a). Compared to the antagonist alone, only the association between the lowest doses of DA and SCH decreased GnRH-3 mRNA levels ($P = 0.036$, Figure 1e). Relatively to DA alone, the GnRH-3 mRNA levels were significantly higher for the treatment associating the medium dose of DA with MCP ($P < 0.05$, Figure 1d) while no significant difference was observed with SCH.

The brain LH β mRNA levels that displayed a high variability (CV = 130%) and a low level of gene expression (Ct around 34-35), did not vary according to any of the treatment ($P > 0.05$, Table 2).

3.2. Regulation of the sex-steroid levels in ovarian culture medium

The absolute production levels varied markedly according to the sex-steroids. The measured concentrations were in the range of 0.3-0.6 ng/mL/g, 3-10 ng/mL/g and 0.5-1.0 ng/mL/g for E₂, T and DHP, respectively.

CHAPITRE III

Regardless the treatments, a time effect was monitored for T and E₂ levels with an increase at 4 h compared with 0 h ($P < 0.001$; data not shown) while no significant change was observed for DHP levels. Within the negative control group, the sex-steroid levels were not modified according to the incubation time ($P > 0.05$; data not shown).

At each incubation time, sex-steroid levels varied also according to the treatment, except at 0 h for which no significant difference was observed for all sex-steroids (data not shown).

Relatively to the negative control, all DA treatments were ineffective to modify T levels after 4 h of incubation (Figure 2a) while DA at 10 μM increased these levels after 8 h ($P < 0.05$, Figure 3a). After 8 h, we also note that the comparison between T levels in the DA group at 1 μM and those observed in the negative control revealed a P -value quite close of the threshold of significance ($P = 0.074$). On the contrary, the MCP and SCH treatments alone failed to induce significant change of T production whatever the doses and the incubation time ($P > 0.05$; Figures 2b and c, Figures 3b and c). Compared to the antagonist alone, no treatment combining DA with an antagonist altered the T levels whatever the incubation time ($P > 0.05$; Figures 2d and e, Figures 3d and e). In contrast, relatively to DA alone, the combination of DA with one antagonist at the medium and high doses decreased the T secretion after 4h ($P < 0.05$; Figures 2d and e) while this decrease was observed with the highest doses of MCP and SCH ($P < 0.001$) and the medium dose of SCH ($P < 0.05$) after 8 h (Figures 3d and e).

Concerning E₂ levels, both DA and antagonist treatments applied alone failed to modify its production compared with the negative control whatever the incubation time ($P > 0.05$, Figures 4a, b and c; Figures 5a, b and c). However, after 8 h, DA at 1 and 10 μM increased E₂ levels in comparison with DA at 0.1 μM ($P < 0.01$; Figure 5a) while the statistical comparisons of DA at 1 μM ($P = 0.07$) and 10 μM ($P = 0.06$) with the negative control led to a P -value just above

CHAPITRE III

the threshold of significance. After 4 h, the association of DA with an antagonist did not modify the E₂ production compared with the antagonist or DA alone ($P > 0.05$, Figures 4d and e). After 8 h, we noticed that relatively to the antagonist alone, the association of DA with MCP decreased the E₂ levels at the low and high doses ($P = 0.031$, Figure 5d) while no significant effect was observed with SCH ($P > 0.05$, Figure 5e). Finally, we observed that the combination of MCP or SCH with DA at the medium and high doses decreased the E₂ production compared with DA alone ($P < 0.05$, Figures 5d and e).

Concerning DHP levels, no significant difference was noticed between the treatments ($P > 0.05$, Table 3).

4. Discussion

For the first time in pikeperch, this study investigated the involvement of DA and its receptors on the local regulation of sex hormones using *in vitro* organ culture.

Neither DA nor both DA receptor antagonists, the SCH (D₁ family) and MCP (D₂ family) modulated with convincing manner the brain GnRH-3 and LH β mRNA levels. These data are in contradiction with *in vitro* studies in goldfish that showed a down-regulation of GnRH release from preoptic-anterior hypothalamus slices with 10 and 100 μ M of DA (Yu et al., 1991; Yu and Peter, 1992) but also with 1 μ M of D₁ antagonist whereas 1 μ M of D₂ antagonist was ineffective (Yu and Peter, 1992). From our knowledge, the regulation of the GnRH system by the DA/receptors complex has received little attention in the brain as most of the studies have focused on the pituitary to evaluate such DA direct action (Dufour et al., 2010). Despite this lack of data, several hypotheses can be made to explain the apparent discrepancy with the present data. First, the brain GnRH gene expression regulation may not be the target of DA in

CHAPITRE III

pikeperch similarly to what was reported for LH β in cultured pituitary cells of tilapia (Melamed et al., 1996). Second, DA might act through other brain molecules to down-regulate GnRH-3 synthesis, making the incubation time insufficient to observe some effects. For instance, DA may inhibit the GABA synthesis that is known as a stimulator of the LH release mainly through the GnRH system (Trudeau, 1997; Hibbert et al., 2005). Third, the GnRH-3 may not be the major reproductive GnRH variant in pikeperch as previously suggested (Khendek et al., 2018). Indeed, Lethimonier et al. (2004) reported that perciform species may possess until three forms of GnRH, the GnRH-1, GnRH-2 and GnRH-3 and the former would be important for the regulation of pituitary secretion (Lethimonier et al., 2004). In addition, Bryant et al. (2016) demonstrated a direct DA inhibition of the GnRH-1 neurons in the hypothalamus of the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. Given the lack of data in pikeperch about the GnRH system, the role of GnRH-1 and its regulation by the dopaminergic system need to be evaluated. Regarding the LH β , the absence of regulation by DA and the antagonists is not surprising given the high variability observed due to a very low gene expression of LH β in the brain. All together, we conclude that DA is not a potent modulator of GnRH-3 and LH β gene expression in the pikeperch brain.

In teleosts, the regulation of sex hormones by the dopaminergic system has received even less attention in the gonad than in the pituitary or the brain. Still, DA receptors are also expressed in the ovaries that open the way of such putative regulation (Roche et al, unpublished data). At the highest dose, DA stimulated the T release from the ovaries after 8 h of incubation while no clear effect was observed for E₂. T is produced from the cholesterol in the theca cells of follicles. It is transported to granulosa cells to be converted to E₂ by the aromatase enzyme (Kagawa et al., 1982; Nagahama and Yamashita, 2008). DA may thus act on some enzymes of this

CHAPITRE III

steroidogenic pathway (e.g. StAR, 3 β HSD, 17 β HSD). Also, Chang et al. (2009) reviewed that DA acts on some actors of the intra-cellular signaling pathways (PKC, PKA..) to inhibit the GnRH-stimulated LH release in brain. Yet, sex-steroid production is due to the activation of such signaling pathways especially PKA, after the binding of gonadotropins to their membrane receptors (Young et al., 2005). Thus we assume that DA might also act on these intra-cellular signaling pathways to stimulate ovarian T production. This regulation would not be associated with an up-regulation of the aromatase activity, as E₂ levels remain quite unaffected. However, considering that DA 1 and DA 10 effects are close to the statistical threshold and that two doses of DA (1 and 10 μ M) increased E₂ levels related to DA 0.1, we cannot rule out an insufficient statistical power to detect some potential slight effects on E₂ levels. Otherwise, it is possible that more incubation time would be necessary to observe clear DA effects on E₂ levels. In any case, from our knowledge we report for the first time in any teleost species a local ovarian DA effect on sex-steroid production.

Given this sex-steroid regulation by DA, it is worthy to investigate which DA receptors are involved in this dopaminergic regulation. No antagonist applied alone induced significant change of T and E₂ levels, suggesting that no residual DA remained active in the ovaries during the experimental period. However, the addition of DA to MCP at the low and high doses decreased E₂ production relatively to the antagonist treatment alone whereas this phenomenon was observed neither with SCH nor on T production.

In presence of the D₁ antagonist at the two highest doses, DA was not able to provoke any further increase of T production after 4 and 8h of incubation. The same effect was observed for E₂ at the same doses but only after 8h of incubation. These results are consistent with the study

CHAPITRE III

of Mori et al. (1994) that demonstrated the involvement of DA/D₁ receptors system in steroidogenesis in ovarian cells from PMSG-treated immature rat. Furthermore, sex-steroids are produced after activation of PKA triggering the increase of cAMP levels (Young et al., 2005). In European eel, *Anguilla anguilla*, Cardinaud et al. (1997) showed that the blockage of the DA effect by SCH decreases the cAMP accumulation that might explain these effects on T and E₂ production in pikeperch. In any case, these results clearly suggest that the D₁ receptors are involved in the T and E₂ production up-regulation in pikeperch ovary, potentially through PKA/cAMP signaling pathways.

Similarly, the addition of MCP to DA prevents from this latter to up-regulate T and E₂ depending on the doses and the sampling time. This suppression of DA effect with the blockage of the D₂ receptors shows that this receptor family is also involved in the regulation of the ovarian steroidogenesis. From our knowledge, it is the first study in teleosts that showed the involvement of both DA receptor families in the ovarian steroidogenesis. In the brain, a similar D₂ regulation was pointed out as the addition of MCP with DA 1 restored the level of GnRH-3 gene expression in comparison with the drop induced by DA alone. This suggests that the D₂ receptors, but not the D₁ ones, are implicated in the down-regulation of cerebral GnRH-3 transcript levels. This supports the results of Bryant et al. (2016) who demonstrated the involvement of the DA/D₂ receptors system in the direct inhibition of GnRH in the hypothalamus of the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. This result is in accordance with the classical DA regulation of the brain-pituitary axis through D₂ receptors in teleosts.

In 2014, Chaube et al. suggested the possible existence of an intraovarian GnRH-gonadotropin axis. Indeed, the expression of LH β , FSH β , glycoprotein α but also GnRH and GnRH-binding sites were described in the ovary of some teleost species (Habibi et al., 1994; Lin and Peter,

CHAPITRE III

1996; Pati and Habibi, 1998; Wong and Zohar, 2004; Wu et al., 2008; Elisio et al., 2012). In catfish ovary, *Heteropneustes fossilis*, the presence of catecholamines (DA, noradrenaline and adrenaline) was also reported (Singh et al., 2010). Although these assumptions need to be verified in pikeperch, the effects in the brain and ovary lead us to raise the hypothesis that the dopaminergic system might interact with this putative intra-ovarian system as it happens in the brain-pituitary axis.

Finally, some results remain difficult to interpret for two reasons. First, it is surprising to notice that the activation of D₁ and D₂ receptors triggers the same sex-steroid up-regulation. Indeed, each receptor family can bind to different G-protein, a G_{αs}/olf for D₁ and a G_{αi}/o for D₂ family potentially exerting contrasted effect on adenylate cyclase activity (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). However, these receptor mechanisms are much more complex (Missale et al., 1998). For instance, Beaulieu and Gainetdinov (2011) reported the possibility to create D₁/D₂ DA receptor heterodimers that might regulate other signaling pathways like the calcium-dependent cell signaling in neurons. These receptor mechanisms might explain the convergent physiological response of D₁ and D₂ receptor families obtained in our study. Second, it is also surprising to observe a decrease of E₂ and GnRH-3 mRNA levels with the addition of DA to MCP and SCH respectively but only for the low and high doses, compared to the antagonist alone. These results suggest that the DA receptors should be blocked to observe such effects and that others mechanisms should be involved. For instance, in human granulosa cells, noradrenaline and adrenaline regulate progesterone secretion through adrenergic β-receptors (Webley et al., 1988). Also, in goldfish, noradrenaline stimulates GnRH release from pre-optic hypothalamus slices (Yu et al., 1991). Using binding competitions, Cornil and Ball (2008) showed that DA

CHAPITRE III

binds to α_2 -adrenergic receptors in mammals and birds. Thus, we can speculate that DA might also act through adrenergic receptors in pikeperch ovary and brain.

During the pre-ovulatory period, DHP is of critical importance in a range of teleost species as it is considered as the MIS (Nagahama and Yamashita, 2008). No treatment induced significant change of the DHP levels that remained relatively low and stable (mean: 0.62 ng/mL/g of tissue) during the experimental period. These low levels of production are in accordance with other studies performed in some perciform species such as the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (Prat et al., 1990), the European perch, *Perca fluviatilis* (Sulistyo et al., 1998), the walleye, *Sander vitreus* (Barry et al., 1995) and the pikeperch (Roche et al., 2018) for which the blood plasma levels are very low. In pikeperch, the injection of the same DA receptor antagonists to maturing females failed to trigger ovulation and to affect the plasma DHP levels (Roche et al., 2018). All together, these results lead us to think that DA and its receptors would not act on the DHP production in the ovary. Some authors suggested that another molecule could be considered as the MIS, the 17α , 20β , 21-tri-hydroxy-4-pregnen-3-one (20β -S or $17, 20, 21$ -P) in perciforms (Nagahama and Yamashita, 2008). Also, in the European sea bass, Asturiano et al. (2000) suggested that both molecules could be involved in the pre-ovulatory period, the DHP at the beginning and the 20β -S at the end of the oocyte maturation process. Thus, it is conceivable that the dopaminergic system acts only on the 20β -S levels in pikeperch. Unfortunately, no information is available on the identity of the MIS in pikeperch and these hypotheses need to be tested. Finally, other molecules should be considered as putative MIS notably the corticosteroids. They can be produced by gonads and they interact with the Hypothalamus-Pituitary-Gonad axis (Milla et al., 2009). These latter authors reviewed that the main corticosteroids may regulate the peri-ovulatory mechanisms notably the induction of the

CHAPITRE III

oocyte meiotic maturation in some teleost species even if high doses are sometimes necessary (Goetz, 1983; Milla et al., 2009). Investigating the effect of DA and its receptors on the ovarian secretion of corticosteroids such as cortisol may shed light on dopaminergic mechanisms linked to the final stages of gametogenesis.

Finally, if DA receptor antagonists neither provoke the advancement of the FOM process in pikeperch (Roche et al., 2018) nor stimulate the DHP production, we may wonder what is the physiological significance of the ovarian sex-steroid regulation pointed out in this study. Indeed, the regulatory profile mediated by the dopaminergic system in the pikeperch ovary is similar between T and E₂ production and generally, E₂ and T are both strongly produced during the vitellogenesis process (Prat et al., 1990; Ciereszko et al., 1997; Sulistyono et al., 1998; Rinchar et al., 1998; Migaud, 2002; Fontaine et al., 2015) with T achieving a peak just before ovulation (Kobayashi et al., 1989; Jackson and Sullivan, 1995; Rinchar et al. 1998; Migaud, 2002). Some studies suggested that E₂ would also reach a peak just before ovulation (Jackson and Sullivan, 1995; Migaud, 2002). Considering our results, we can make two hypotheses. First, DA would act during the vitellogenesis phase, the reproductive period during which E₂ and T are most likely to be produced together at significant levels (Khendek et al., 2018). In this case, the herein reported role of DA on the sex-steroid regulation during the final oocyte meiotic maturation should be minimized, as it would reveal an earlier implication in the vitellogenesis process as suggested in other teleost species (Vacher et al., 2002; Aizen et al., 2005; Fontaine et al., 2013). Second, DA would act at the pre-ovulatory period to induce increase of T and potentially E₂ levels just before ovulation. However, those DA mechanisms in the ovary should be clarified by investigating the role and the plasma change of T and E₂ during the pre-ovulatory period in pikeperch.

CHAPITRE III

In conclusion, we showed for the first time that DA increased T production through both D₁ and D₂ receptor families at the ovarian level. Although DA effects on E₂ production need to be confirmed, we demonstrated that both receptor families are also involved in its regulation. Concerning the regulation of the brain GnRH-3 gene expression, only the D₂ receptors family was involved. Finally, the dopaminergic system was involved neither in brain LHβ gene expression regulation nor in ovarian DHP production. Thus, these results clearly show that the dopaminergic system is involved at both brain and ovarian levels to regulate GnRH-3 synthesis and sex-steroids production (T and E₂), respectively through the D₁ and/or the D₂ receptors in pikeperch.

Acknowledgement: We thank the DyNAMIC and LAE laboratories (Université de Lorraine, France) for the access to the NanoDrop Spectrophotometer and the q-PCR thermocycler, respectively.

Funding: This work was supported by the Eurostars project (E!9390 TRANSANDER); the Region Lorraine and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, projects CENAKVA (No CZ.1.05/2.1.00/01.0024) and CENAKVA II (No. LO1205 under the NPU I program).

References

- Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B and Rosenfeld H 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 142, 212–221.
- Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M and Zanuy S 2000. Hormonal

CHAPITRE III

- regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology* 56, 1155–1172.
- Barry TP, Malison JA, Lapp AF and Procarione LS 1995. Effects of selected hormones and male cohorts on final oocyte maturation, ovulation, and steroid production in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture* 138, 331–347.
- Bates D, Maechler Martin, Bolker B and Walker S 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *Journal of statistical software* 67, 1–48.
- Beaulieu J-M and Gainetdinov RR 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews* 63, 182–217.
- Benjamini Y and Hochberg Y 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300.
- Bryant AS, Greenwood AK, Juntti SA, Byrne AE and Fernald RD 2016. Dopaminergic inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Experimental Biology*.
- Cardinaud B, Sugamori KS, Coudouel S, Vincent J-D, Niznik HB and Vernier P 1997. Early emergence of three dopamine D1 receptor subtypes in vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 2778–2787.
- Chang JP, Yu KL, Wong AOL and Peter RE 1990. Differential Actions of Dopamine Receptor Subtypes on Gonadotropin and Growth Hormone Release in vitro in Goldfish. *Neuroendocrinology* 51, 664–674.
- Chang JP, Johnson JD, Sawisky GR, Grey CL, Mitchell G, Booth M, Volk MM, Parks SK, Thompson E, Goss GG, Klausen C and Habibi HR 2009. Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in

CHAPITRE III

- teleosts—studies on the goldfish model. *General and Comparative Endocrinology* 161, 42–52.
- Chaube R, Singh RK and Joy KP 2014. Effects of ovaprim, a commercial spawning inducer, on vasotocin and steroid hormone profiles in the catfish *Heteropneustes fossilis*: *in vivo* and *in vitro* studies. *General and Comparative Endocrinology* 195, 190–200.
- Ciereszko RE, Dabrowski K, Ciereszko A, Ebeling J and Ottobre JS 1997. Effects of temperature and photoperiod on reproduction of female yellow perch *Perca flavescens*: plasma concentrations of steroid hormones, spontaneous and induced ovulation, and quality of eggs. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 344–356.
- Copeland PA and Thomas P 1989. Control of gonadotropin release in the atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 74, 474–483.
- Cornil CA and Ball GF 2008. Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals. *The Journal of comparative neurology* 511, 610–27.
- Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K and Pasqualini C 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology* 76, 129–160.
- Elisio M, Soria FN, Fernandino JI, Strüssmann CA, Somoza GM and Andrés Miranda L 2012. Extrahypophyseal expression of gonadotropin subunits in pejerrey *Odontesthes bonariensis* and effects of high water temperatures on their expression. *General and Comparative Endocrinology* 175, 329–336.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2017. Cultured aquatic species information programme. *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758). Retrieved on 10 July 2017 from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sander_lucioperca/en

CHAPITRE III

- Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloché S, Gonnet F, Vernier P, Dufour S and Pasqualini C 2013. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Endocrinology* 154, 807–818.
- Fontaine P, Wang N, Hermelink B 2015. Broodstock management and control of the reproductive cycle. In *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices* (eds. Kestemont P, Dabrowski K, and Summerfelt RC), pp. 103-122. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Fox J and Weisberg S 2011. *An R companion to applied Regression*. SAGE Publications, Inc.
- Goetz FW 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In *Fish Physiology*, pp. 117–170. Academic Press, Inc.
- Habibi HR, Pati D, Ouwens M and Goos HJT 1994. Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites and compounds with GnRH-like activity in the ovary of african catfish, *Clarias gariepinus*. *Biology of Reproduction* 50, 643–652.
- Hermelink B, Wuertz S, Trubiroha A, Rennert B, Kloas W and Schulz C 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *General and Comparative Endocrinology* 172, 282–292.
- Hervé M 2016. *RVAideMemoire*: diverse basic statistical and graphical functions. R package version 0.9-61.
- Hibbert B, Fung I, McAuley R, Samia M and Trudeau V 2005. Catecholamine depletion modulates serum LH levels, GAD67 mRNA, and GABA synthesis in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 140, 176–183.
- Jackson LF and Sullivan C V. 1995. Reproduction of white perch: the annual gametogenic cycle. *Transactions of the American Fisheries Society* 124, 563–577.
- Jolly C, Rousseau K, Prézeau L, Vol C, Tomkiewicz J, Dufour S and Pasqualini C 2016.

CHAPITRE III

- Functional characterisation of eel dopamine D2 receptors and involvement in the direct inhibition of pituitary gonadotrophins. *Journal of Neuroendocrinology* 28, 1–15.
- Kagawa H, Young G, Adachi S and Nagahama Y 1982. Estradiol-17 β Production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *General and Comparative Endocrinology* 47, 440–448.
- Kah O, Chambolle P, Thibault J and Geffard M 1984. Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. *Neuroscience Letters* 48, 293–298.
- Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J and Peter RE 1987. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45, 451–458.
- Kestemont P, Dabrowski K and Summerfelt RC 2015. *Biology and culture of percid fishes: Principles and practices*. Springer. p 901
- Khendek A, Chakraborty A, Roche J, Ledoré Y, Personne A, Policar T, Źarski D, Mandiki R, Kestemont P, Milla S and Fontaine P 2018. Rearing conditions and life history influence the progress of gametogenesis and reproduction performances in pikeperch males and females. *animal*, 1–12.
- Kobayashi M, Aida K and Hanyu I 1989. Involvement of steroid hormones in the preovulatory gonadotropin surge in female goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 141–146.
- Lenth R 2016. Least-Squares Means: The R package lsmeans. *Journal of Statistical Software* 69, 1–33.
- Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA, Lareyre JJ and Kah O 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 135, 1–16.
- Levavi-Sivan B, Ofir M and Yaron Z 1995. Possible sites of dopaminergic inhibition of

CHAPITRE III

- gonadotropin release from the pituitary of a teleost fish, tilapia. *Molecular and Cellular Endocrinology* 109, 87–95.
- Lin X-W and Peter RE 1996. Expression of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II precursor messenger ribonucleic acids in the brain and ovary of goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 101, 282–296.
- Lubzens E, Young G, Bobe J and Cerdà J 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165, 367–389.
- Mañanós EL, Duncan N and Mylonas CC 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. (eds. E. Cabrita, V. Robles and M. Herraéz), pp. 3–80. Boca Raton.
- Melamed P, Gur G, Elizur A, Rosenfeld H, Sivan B, Rentier-Delrue F and Yaron Z 1996. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin β subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64, 320–328.
- Migaud H 2002. Influence des variations de la température et de la photopériode sur le cycle de reproduction et la qualité des pontes de la perche commune, *Perca fluviatilis*. Henri Poincaré, Nancy 1, 167pp.
- Milla S, Wang N, Mandiki SNM and Kestemont P 2009. Corticosteroids: friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 153, 242–251.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78, 189–225.
- Mori H, Arakawa S, Ohkawa T, Ohkawa R, Takada S, Morita T and Okinaga S 1994. The

CHAPITRE III

- involvement of dopamine in the regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Hormone Research in Paediatrics* 41, 36–40.
- Nagahama Y and Yamashita M 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation* 50, 195–219.
- Pati D and Habibi HR 1998. Presence of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and compounds with GnRH-like activity in the ovary of goldfish. *Endocrinology* 139, 2015–2024.
- Pohlert T 2016. The Pairwise Multiple Comparisons of Mean Ranks package (PMCMR), R Package.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, De Mones A and Foptier A 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology* 78, 361–373.
- Rinchar J, Poncin P and Kestemont P 1998. Croissance ovocytaire et régulation stéroïdienne chez les poissons à pontes unique et multiples : une revue. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 34, 211–225.
- Roche J, Źarski D, Khendek A, Ben Ammar I, Broquard C, Depp A, Ledoré Y, Policar T, Fontaine P and Milla S 2018. D1, but not D2, dopamine receptor regulates steroid levels during the final stages of pikeperch gametogenesis. *animal*, 1–11.
- Singh V, Chaube R, Chourasia TK and Joy KP 2010. Temporal and periovulatory changes in ovarian catecholamines in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *General and Comparative Endocrinology* 168, 46–54.
- Singh U, Kumar S and Singru PS 2012. Interaction between dopamine- and isotocin-containing neurones in the preoptic area of the catfish, *Clarias batrachus*: role in the regulation of luteinising hormone cells. *Journal of Neuroendocrinology* 24, 1398–1411.

CHAPITRE III

- Sulistyo I, Rinchar J, Fontaine P, Gardeur J, Capdeville B and Kestemont P 1998. Reproductive cycle and plasma levels of sex steroids in female Eurasian perch. *Aquatic Living Resources* 11, 101–110.
- Trudeau V 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of Reproduction* 2, 55–68.
- Vacher C, Ferrière F, Marmignon M-H, Pellegrini E and Saligaut C 2002. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. *General and comparative endocrinology* 127, 198–206.
- Van Goor F, Goldberg JI and Chang JP 1998. Dopamine-D2 actions on voltage-dependent calcium current and gonadotropin-ii secretion in cultured goldfish gonadotrophs. *Journal of Neuroendocrinology* 10, 175–186.
- Wang X, Zhao T, Wei H and Zhou H 2011. Regulation of dopamine D2 receptor expression in grass carp pituitary cells: A possible mechanism for dopaminergic modification of luteinizing hormone synthesis. *General and Comparative Endocrinology* 173, 48–55.
- Webley GE, Luck MR and Hearn JP 1988. Stimulation of progesterone secretion by cultured human granulosa cells with melatonin and catecholamines. *Journal Reproduction Fertility* 84, 669–677.
- Wong T-T and Zohar Y 2004. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Endocrinology* 145, 5210–5220.
- Wu F, Zhang X, Zhang W, Huang B, Liu Z, Hu C and Wang D 2008. Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 153, 44–48.
- Xing L, Esau C and Trudeau VL 2016. Direct regulation of aromatase B expression by 17 β -estradiol and dopamine D1 receptor agonist in adult radial glial cells. *frontiers in*

CHAPITRE III

- Neuroscience 9, 1–11.
- Yamamoto K, Fontaine R, Pasqualini C and Vernier P 2015. Classification of dopamine receptor genes in vertebrates: nine subtypes in Osteichthyes. *Brain Behaviour and Evolution* 86, 164–175.
- Yaron Z and Levavi-Sivan B 2011. Endocrine regulation of fish reproduction. In *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, pp. 1500–1508. Elsevier Inc., San Diego.
- Young G, Kusakabe M, Nakamura I, Lokman PM and Goetz FW 2005. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. In *Hormones and their receptors in fish reproduction* (eds. P. Melamed and N. Sherwood), pp. 155–223. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, London.
- Yu KL, Rosenblum PM and Peter RE 1991. *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 81, 256–267.
- Yu KL and Peter RE 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 85, 138–146.
- Żarski D, Kucharczyk D, Targonska K, Palińska K, Kupren K, Fontaine P and Kestemont P 2012. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research* 43, 713–721.

CHAPITRE III

Table 1: Primers used for real-time PCR

		Sequences (5'-3')	Size (bp)
GnRH-3	Forward	GCACTGGTCCTATGGATGGT	192
	Reverse	GGGAACCTTCTCTTTTCGGTCAA	
LH β	Forward	GTGTCACCTAGTGGAAC	134
	Reverse	GGGAGCTTAAAGGTCTTG	
Act b	Forward	AATCCACGAGACCACCTACAAC	210
	Reverse	CCTCCGATCCAGACAGAGTATT	
RPL8	Forward	GTTATCGCCTCTGCCAC	163
	Reverse	ACCGAAGGGATGCTCAAC	

CHAPITRE III

Table 2: Relative mRNA levels of LHβ¹ after brain exposition to different treatments

	Doses (μM)	Relative mRNA LH levels
Negative control	/	0.05 ± 0.02
DA	0.1	0.04 ± 0.02
	1	0.07 ± 0.04
	10	0.03 ± 0.02
MCP	0.5	0.06 ± 0.02
	5	0.05 ± 0.02
	50	0.03 ± 0.01
DA & MCP	0.1 & 0.5	0.10 ± 0.04
	1 & 5	0.03 ± 0.02
	10 & 50	0.03 ± 0.02
SCH	0.5	0.10 ± 0.05
	5	0.03 ± 0.01
	50	0.10 ± 0.06
DA & SCH	0.1 & 0.5	0.09 ± 0.06
	1 & 5	0.15 ± 0.06
	10 & 50	0.19 ± 0.10

DA : dopamine ; MCP : metoclopramide ; SCH : SCH23390

¹ Values are expressed as mean ± SEM

CHAPITRE III

Table 3: DHP levels (ng/mL/g of tissue)¹ after ovary exposition to treatments

	Doses (μ M)	Incubation time	
		4h	8h
Negative control	/	0.89 \pm 0.21	0.78 \pm 0.12
DA	0.1	0.51 \pm 0.23	0.78 \pm 0.26
	1	0.82 \pm 0.02	0.74 \pm 0.09
	10	0.55 \pm 0.25	1.08 \pm 0.50
MCP	0.5	0.49 \pm 0.21	0.60 \pm 0.18
	5	/	0.80 \pm 0.17
	50	0.42 \pm 0.09	0.44 \pm 0.14
DA & MCP	0.1 & 0.5	0.69 \pm 0.03	0.72 \pm 0.26
	1 & 5	/	0.50 \pm 0.24
	10 & 50	0.40 \pm 0.20	0.61 \pm 0.29
SCH	0.5	0.50 \pm 0.11	0.58 \pm 0.19
	5	/	0.61 \pm 0.04
	50	0.41 \pm 0.18	0.46 \pm 0.21
DA & SCH	0.1 & 0.5	0.43 \pm 0.19	0.45 \pm 0.19
	1 & 5	0.76 \pm 0.29	0.85 \pm 0.11
	10 & 50	0.56 \pm 0.09	0.70 \pm 0.17

DA : dopamine ; MCP : metoclopramide ; SCH : SCH23390

¹ Values are expressed as mean \pm SEM

CHAPITRE III

Figure 1: GnRH-3 gene expression in pikeperch after 8h of brain incubation with different molecules. Comparisons between culture medium without molecules added (Negative control) and (a) three dopamine (DA) doses 0.1, 1 and 10 μM ; (b) three metoclopramide (MCP, D₂ antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM ; (c) three SCH23390 (SCH, D₁ antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM . For each dose (Low, Medium and High dose), comparisons of (d) the association of MCP with DA (DA + MCP) with MCP alone and DA alone and (e) the association of SCH with DA (DA + SCH) with SCH alone and DA alone. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 4 to 6 organs per treatment). Asterisk represents a significant difference * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Figure 2: Testosterone (T) concentrations in culture medium after 4h of ovary incubation with different molecules. Comparisons between culture medium without molecules added (Negative control) and (a) three dopamine (DA) doses 0.1, 1 and 10 μM ; (b) three metoclopramide (MCP, D₂ antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM ; (c) three SCH23390 (SCH, D₁ antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM . For each dose (Low, Medium and High dose), comparisons of (d) the association of MCP with DA (DA + MCP) with MCP alone and DA alone and (e) the association of SCH with DA (DA + SCH) with SCH alone and DA alone. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 5 to 6 culture medium per treatment). Asterisk represents a significant difference * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Figure 3: Testosterone (T) concentrations in culture medium after 8h of ovary incubation with different molecules. Comparisons between culture medium without molecules added (Negative control) and (a) three dopamine (DA) doses 0.1, 1 and 10 μM ; (b) three metoclopramide (MCP, D₂ antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM ; (c) three SCH23390 (SCH, D₁

CHAPITRE III

antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM . For each dose (Low, Medium and High dose), comparisons of (d) the association of MCP with DA (DA + MCP) with MCP alone and DA alone and (e) the association of SCH with DA (DA + SCH) with SCH alone and DA alone. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 5$ to 6 culture medium per treatment). Different letters indicate significant difference between experimental treatments. Asterisk represents a significant difference * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

Figure 4: 17β estradiol (E_2) concentrations in culture medium after 4h of ovary incubation with different molecules. Comparisons between culture medium without molecules added (Negative control) and (a) three dopamine (DA) doses 0.1, 1 and 10 μM ; (b) three metoclopramide (MCP, D_2 antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM ; (c) three SCH23390 (SCH, D_1 antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM . For each dose (Low, Medium and High dose), comparisons of (d) the association of MCP with DA (DA + MCP) with MCP alone and DA alone and (e) the association of SCH with DA (DA + SCH) with SCH alone and DA alone. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 5$ to 6 culture medium per treatment).

Figure 5: 17β estradiol (E_2) concentrations in culture medium after 8h of ovary incubation with different molecules. Comparisons between culture medium without molecules added (Negative control) and (a) three dopamine (DA) doses 0.1, 1 and 10 μM ; (b) three metoclopramide (MCP, D_2 antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM ; (c) three SCH23390 (SCH, D_1 antagonist) doses 0.5, 5 and 50 μM . For each dose (Low, Medium and High dose), comparisons of (d) the association of MCP with DA (DA + MCP) with MCP alone and DA alone and (e) the association of SCH with DA (DA + SCH) with SCH alone and DA alone. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 5$ to 6 culture medium per treatment). Different letters indicate

CHAPITRE III

significant difference between experimental treatments. Asterisk represents a significant difference * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Figure 1

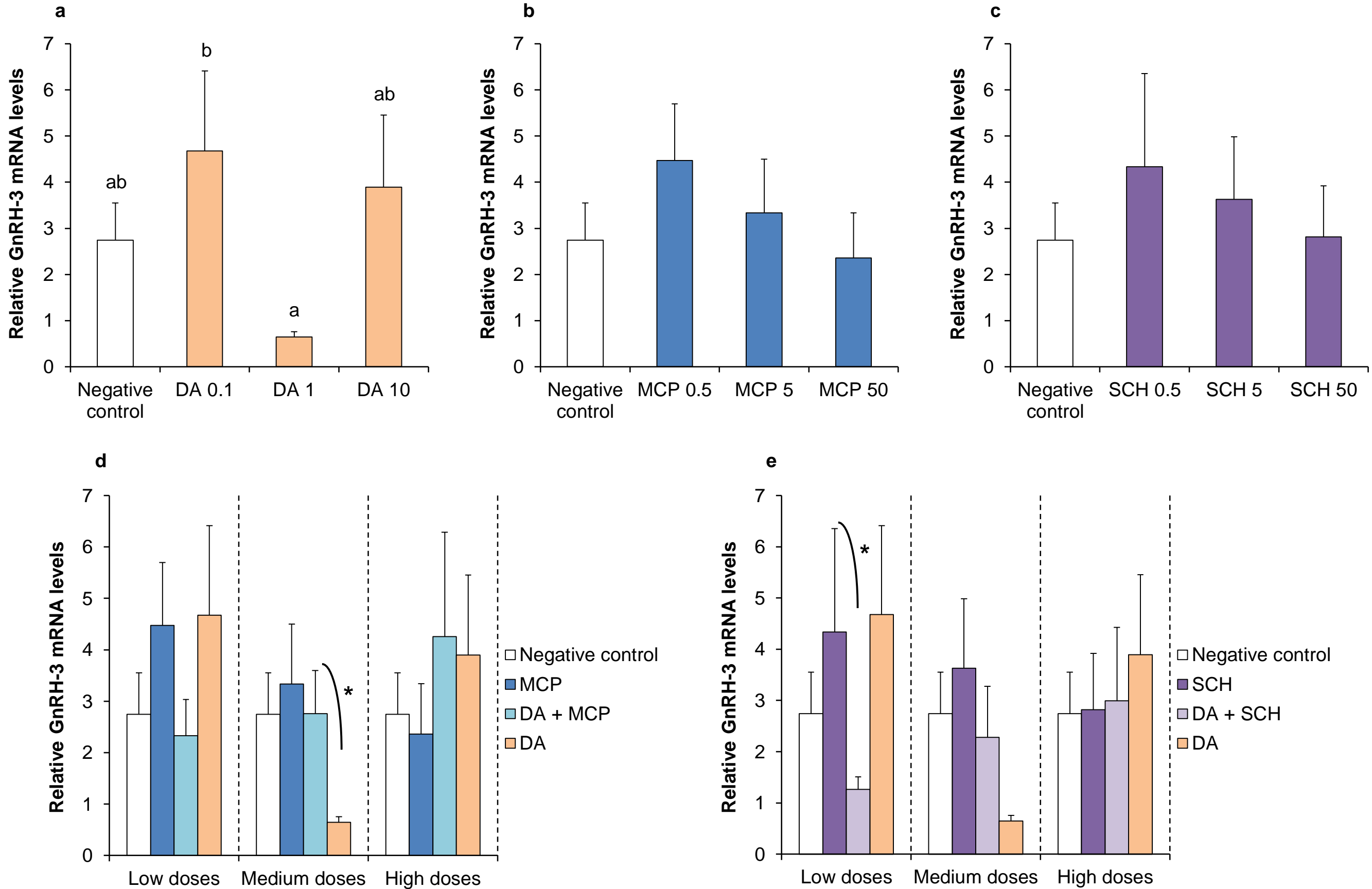


Figure 2

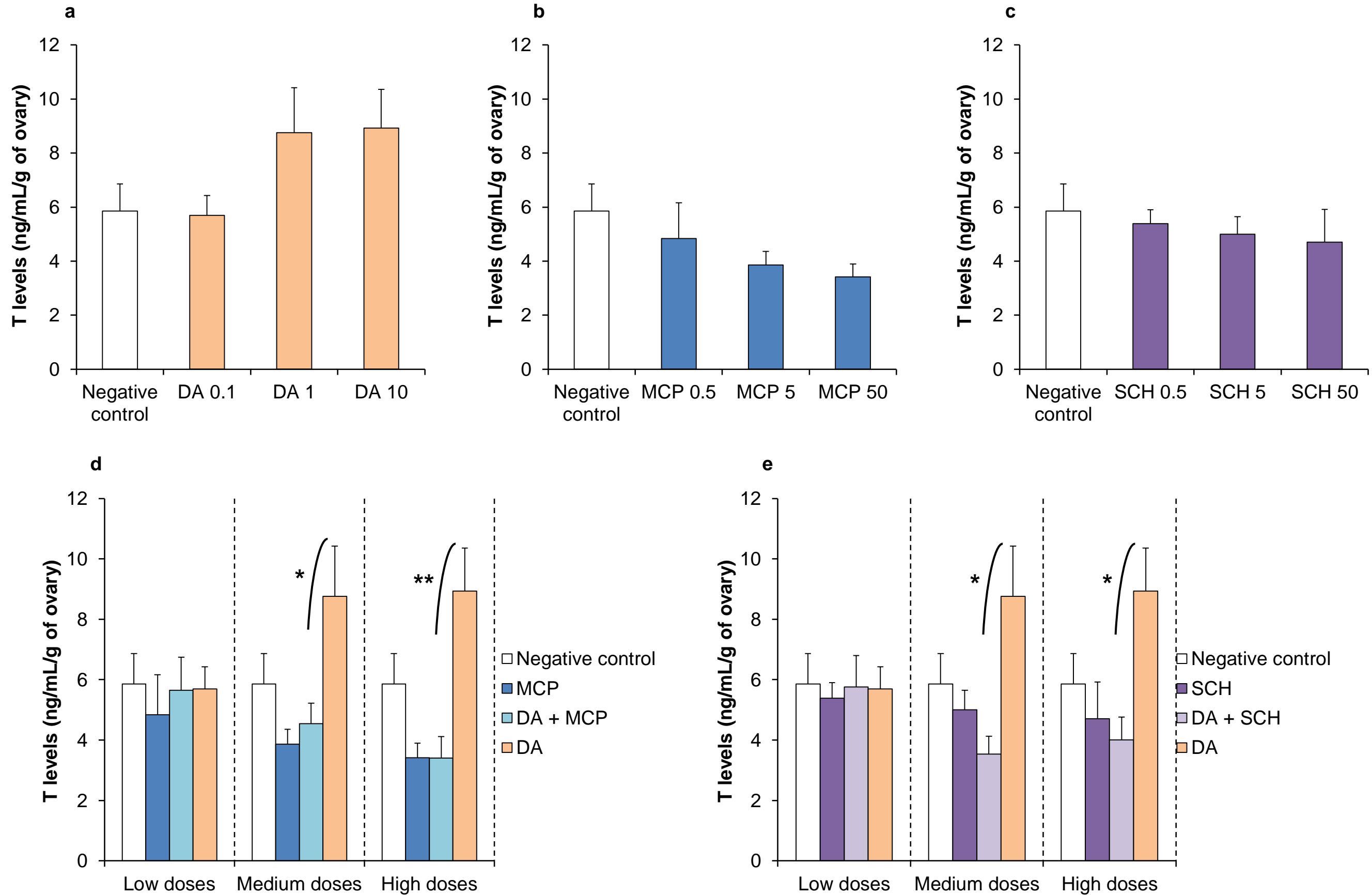


Figure 3

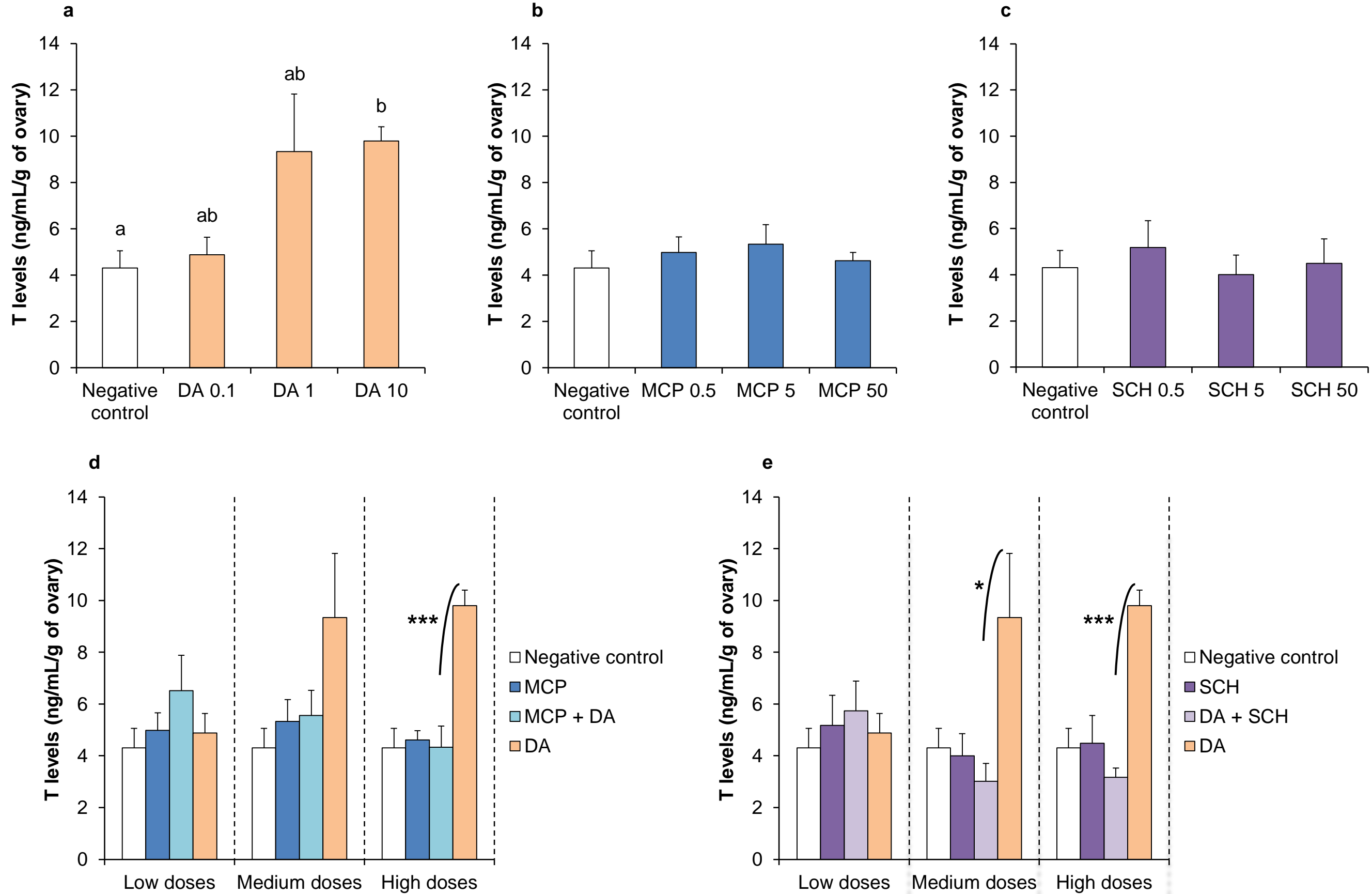


Figure 4

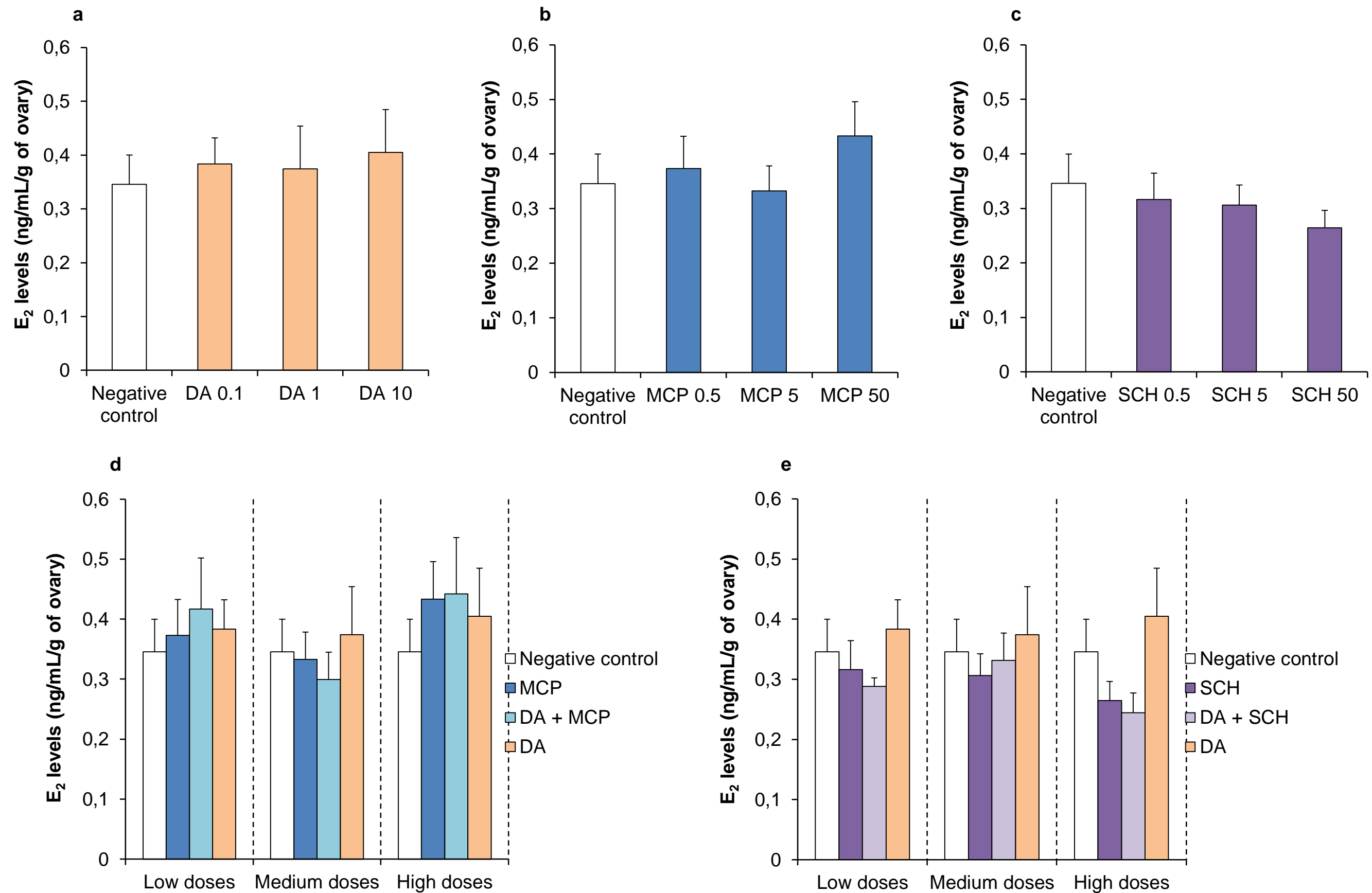
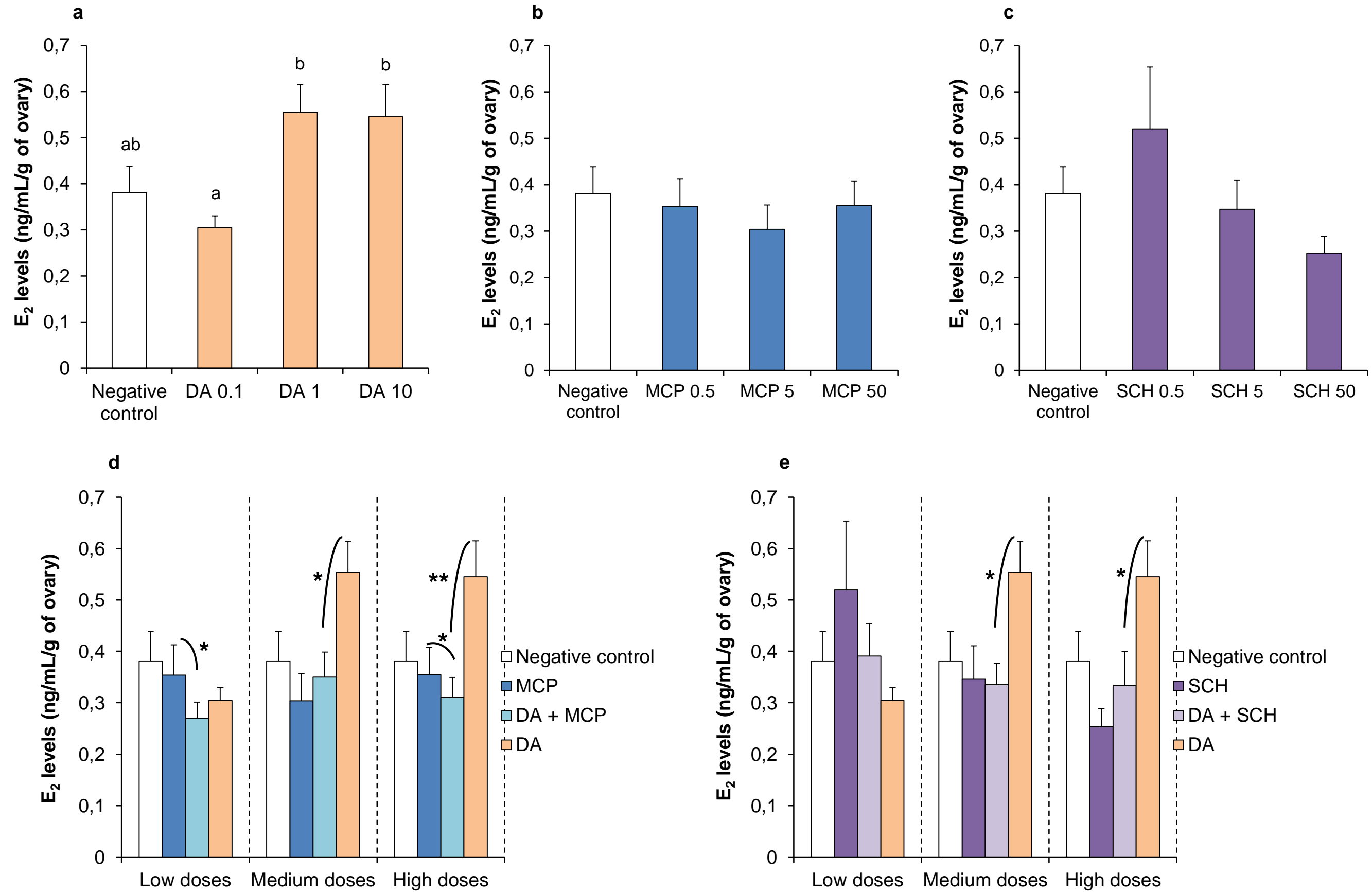


Figure 5



**DISCUSSION
GENERALE**

DISCUSSION GENERALE

1. Rappel des objectifs et plan de la discussion

Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement d'une pisciculture durable par la domestication de nouvelles espèces d'intérêt. Depuis plusieurs années, le sandre est apparu comme une espèce prometteuse pour cette diversification en raison de sa valeur économique (valeur commerciale, valeur récréative et qualité de sa chair) due à sa rareté. Toutefois, le développement et la pérennisation de sa production aquacole nécessite, notamment la compréhension et la maîtrise de son cycle de reproduction. Chez de nombreuses espèces de téléostéens, le système dopaminergique est apparu comme inhibiteur de ce cycle en bloquant la libération de LH et l'ovulation par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₂ (Dufour et al., 2010). Chez le sandre, de nombreux traitements, notamment à base d'antagonistes des récepteurs D₂ de la DA sont apparus prometteurs pour induire l'ovulation du sandre mais aucun n'est apparu totalement satisfaisant (Żarski et al., 2015b). De plus, bien que certaines études aient suggéré que la deuxième famille des récepteurs de la DA, la famille D₁ soit impliquée dans la fonction de reproduction (Yu et Peter, 1992; Popesku et al., 2010, 2012; Xing et al., 2016), aucune n'a cherché à bloquer ces récepteurs pour induire l'ovulation du sandre. Enfin, non seulement aucune information n'est disponible sur les récepteurs de la DA qui existent chez cette espèce mais les mécanismes biologiques induits suite au blocage de ces récepteurs n'ont également jamais été étudiés.

Ainsi, dans un objectif d'optimisation de la reproduction du sandre, nous nous sommes intéressés aux récepteurs de la DA et à leur implication dans le contrôle de l'axe gonadotrope pilotant notamment l'induction des phases finales de l'ovogenèse.

Cette discussion sera divisée en trois grandes parties pour finir sur une conclusion générale. Dans une première partie, nous discuterons de l'implication des récepteurs de la DA, et plus particulièrement ceux de la famille D₁, dans la régulation de l'axe gonadotrope lors des phases finales de l'ovogenèse suite à des analyses *in vivo* et *in vitro*. Nous essaierons notamment de comprendre pourquoi ces deux études ont donné des résultats apparemment contradictoires. Dans une seconde partie, nous discuterons de l'implication de ces récepteurs dans l'induction de la maturation méiotique ovocytaire et de l'ovulation. Dans une troisième et dernière partie, nous discuterons des limites de notre étude.

2. Implication des récepteurs de la DA dans la régulation de l'axe gonadotrope

Initialement, dans le cadre de cette thèse, nous cherchions à déterminer quel pouvait être l'effet de traitements à base d'antagonistes des récepteurs de la DA de la famille D₁ et D₂ sur la régulation de l'axe gonadotrope en phase pré-ovulatoire chez le sandre. Plus précisément, nous voulions savoir si les récepteurs de la famille D₁ étaient impliqués dans le déclenchement et l'avancement de la maturation méiotique ovocytaire comme suggéré précédemment (Yu et Peter, 1992; Popesku et al., 2010, 2012; Xing et al., 2016). Dans la partie ci-dessous, nous avons donc cherché à comprendre le rôle des récepteurs de cette famille D₁ dans l'activation de l'axe gonadotrope par l'injection d'un antagoniste des récepteurs de la famille D₁.

2.1. Quel est le rôle des récepteurs de la famille D₁ *in vivo* ?

Dans l'objectif de comprendre ce rôle des récepteurs de la DA, et notamment des récepteurs de la famille D₁ dans la régulation de l'axe gonadotrope, nous avons injecté deux antagonistes, le SCH23390 (SCH, antagoniste de la famille D₁) et la métoclopramide (MCP, antagoniste de la famille D₂) en association (expérience 2) ou non (expérience 1) avec une molécule analogue de la sGnRH (sGnRHa ; Cf. Chapitre I). Dans cette étude, nous sommes partis du postulat que chaque antagoniste était spécifique de chacune des familles de récepteurs comme l'avait démontré Cardinaud et son équipe pour la famille des récepteurs D₁ avec le SCH chez l'anguille d'Europe (Cardinaud et al., 1997).

Par cette étude *in vivo*, qui est composée de deux expériences différentes, nous avons montré que seuls, les antagonistes de la famille D₁ et D₂ n'ont pas d'effet (Cf. Chapitre I : expérience 1) alors qu'en application avec la sGnRHa, l'injection du SCH augmentait les concentrations plasmatiques de T et d'E₂ ce qui n'a pas été observé lors de l'injection de la MCP (Cf. Chapitre I : expérience 2). Ces résultats ne vont pas dans le sens de la majorité des études rapportant que c'est la famille des récepteurs D₂ qui est impliquée dans l'inhibition dopaminergique du système GnRH au niveau cérébral et sur la production de LH au niveau hypophysaire (Dufour et al., 2010; Bryant et al., 2016). Nos résultats sont également en contradiction avec l'étude de Chaube et al. (2014) qui ont mesuré les niveaux de stéroïdes sexuels plasmatiques suite à l'injection de l'Ovaprim (sGnRHa associé à un antagoniste des récepteurs D₂). Ils ont montré que ce traitement provoque une diminution des concentrations plasmatiques d'E₂ et de T chez la femelle de poisson-chat gravide. Toutefois, ces auteurs

DISCUSSION GENERALE

n'apportent aucune information sur l'implication des récepteurs de la famille D₁. A notre connaissance, aucune étude n'a mesuré les niveaux de stéroïdes sexuels plasmatiques suite à l'application d'un antagoniste des récepteurs de la famille D₁. Notre étude a donc permis de mettre en évidence le rôle possible de cette famille de récepteurs dans la production des stéroïdes sexuels (T et E₂) en période pré-ovulatoire chez un téléostéen. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la DA serait impliquée dans la régulation de la stéroïdogénèse, pendant la maturation méiotique ovocytaire, mais uniquement par l'intermédiaire de la famille des récepteurs D₁ chez le sandre.

Toutefois, les mécanismes d'actions impliqués dans cette régulation de la stéroïdogénèse par l'intermédiaire de la famille des récepteurs D₁ demeurent complètement inconnus. Dans la partie suivante, nous avons donc cherché à comprendre comment et surtout à quel niveau de l'axe gonadotrope pouvait agir le SCH pour induire une augmentation de la production de T et d'E₂ chez les femelles.

2.2. A quel niveau de l'axe gonadotrope agirait la SCH23390 *in vivo* ?

Dans l'objectif de comprendre cet effet *in vivo* de la SCH sur la stéroïdogénèse, trois hypothèses ont été émises.

2.2.1. Première hypothèse : le SCH23390 agit au niveau cérébral

Le SCH étant un antagoniste capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Johansson et al., 2005), le blocage des récepteurs D₁ pourrait avoir lieu au niveau cérébral. Ce blocage permettrait de lever l'inhibition dopaminergique exercée sur le système GnRH pour favoriser la production successive de GnRH, de LH et des stéroïdes sexuels (Yaron et Levavi-Sivan, 2011). Par ailleurs, il est aussi possible que le système dopaminergique interagisse avec d'autres acteurs cérébraux tels que l'aromatase B (Marsh et al., 2006; Diotel et al., 2010; Popesku et al., 2012). Chez les téléostéens, l'aromatase est codée par deux gènes paralogues, l'aromatase A, majoritairement exprimé dans la gonade, et l'aromatase B, majoritairement exprimé dans le cerveau (Diotel et al., 2010). Par une étude *in vivo*, Popesku et son équipe ont montré que l'agoniste des récepteurs D₁ de la DA, le SKF 38393, régule négativement l'expression du gène de l'aromatase B dans l'hypothalamus (Popesku et al., 2012). Or, la production des stéroïdes sexuels est liée à l'activité aromatase (Diotel et al., 2010). Ainsi, notre hypothèse est que, *in vivo*, le SCH, via les récepteurs de la famille D₁, bloquerait l'inhibition

DISCUSSION GENERALE

dopaminergique exercée sur la transcription de l'aromatase B, ce qui pourrait favoriser en retour la stimulation de la production de ces stéroïdes (Milla et al., 2009a). Toutefois, cet effet hypothétique du SCH ne serait pas obligatoirement en lien avec la fonction de reproduction. En effet, l'E₂ et l'aromatase B sont impliquées dans d'autres fonctions telles que la neurogenèse (Diotel et al., 2010).

2.2.2. Seconde hypothèse : le SCH23390 agit au niveau hypophysaire

On peut également émettre l'hypothèse que le SCH, dans notre étude *in vivo*, agirait directement au niveau de l'hypophyse. Le SCH bloquerait ainsi les récepteurs de la famille D₁ permettant d'une part la production de la LH et en retour la production de T et d'E₂ au niveau des ovaires.

2.2.3. Troisième hypothèse : le SCH23390 agit au niveau ovarien

A l'issue de notre étude *in vivo*, notre dernière hypothèse était que le SCH libéré suite à l'injection agirait directement au niveau des ovaires pour augmenter la synthèse des stéroïdes sexuels (T et E₂), en bloquant les récepteurs de la famille D₁. En effet, non seulement des études ont mis en évidence que ces récepteurs D₁ sont exprimés dans l'ovaire de certains mammifères (Mayerhofer et al., 1999; King et al., 2005) mais d'autres études *in vitro* sur des ovaires de rats ont montré que ce système dopaminergique serait impliqué dans la régulation positive de la stéroïdogénèse par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₁ (Isobe, 1994; Mori et al., 1994).

Chez le sandre, les récepteurs dopaminergiques n'ont jamais été caractérisés. Or, la compréhension de l'effet d'une molécule, notamment d'un antagoniste, et de son lieu d'action nécessite d'avoir une vision globale des récepteurs existants et de leur profil d'expression dans les différents tissus. Par la suite nous avons donc cherché à identifier et à établir le profil d'expression des récepteurs de la DA (*Cf. Chapitre II*) et nous nous sommes aperçus qu'ils ne permettaient pas d'éliminer certaines de nos hypothèses.

2.3. Des récepteurs et leur profil d'expression au service de nos trois hypothèses ?

Afin de comprendre à quel niveau de l'axe gonadotrope agissait le SCH, nous avons, dans un premier temps, établi le répertoire des récepteurs de la DA existants chez le sandre (*Cf. Chapitre II*). Nous avons mis en évidence l'existence (1) de dix séquences de récepteurs se

DISCUSSION GENERALE

répartissant au sein des deux familles de récepteurs de la DA, (2) de plusieurs sous-types de récepteurs par famille, trois dans la famille D₁ (D_{1A}, D_{1B}, D_{1C}) et quatre dans la famille D₂ (D₂, D_{2l}, D₃, D₄ et D_{4rs}), qui peuvent chacun être codé par un ou plusieurs gènes ainsi que celle (3) d'un épissage alternatif à l'origine de deux isoformes du sous-type D₂. Chez les vertébrés, la classification des récepteurs de la DA est très complexe. Le nombre de sous-types, de récepteurs ainsi que le nombre de gènes codant chaque sous-type de récepteurs est différent selon l'espèce étudiée. Yamamoto et al. (2015) ont suggéré que l'ancêtre commun des Ostéichthyens possédait quatre sous-types de récepteur dans la famille D₁ (D_{1A}, D_{1B}, D_{1C} et D_{1E}) et cinq sous-types dans la famille D₂ (D₂, D_{2l}, D₃, D₄, D_{4rs}). Chez le poisson zèbre, à la différence de certaines espèces de mammifères ou d'oiseaux qui ont perdu certains gènes ou sous-types, tous les sous-types de récepteurs ont été conservés, certains étant codés par deux gènes paralogues à l'exception des sous-types D_{1E}, D_{2l}, D₃ et D_{4rs}. Chez le sandre, à l'exception des sous-types D₄ et D_{1E}, tous ont été identifiés dans notre étude (*Cf Chapitre II*) ce qui confirme une grande complexité dans l'organisation des récepteurs de la DA. De plus, notre espèce, parmi les rares téléostéens qui ont fait l'objet d'une telle investigation, est l'une des seules à afficher un épissage alternatif des récepteurs D₂ ce qui accroît encore plus la complexité de son système dopaminergique.

Dans un second temps, nous avons établi un profil d'expression pour certaines des séquences précédemment identifiées chez le sandre (*Cf. Chapitre II*). Parmi ces récepteurs, nous avons réussi à amplifier les récepteurs D_{1Aa} et D_{1Ab} pour la famille D₁ ainsi que D_{2l}, D₃ et D_{4rs} pour la famille D₂ au niveau cérébral, hypophysaire mais également ovarien. La présence de ces récepteurs aux trois niveaux de l'axe gonadotrope renforce nos hypothèses d'un effet du SCH aux différents niveaux de l'axe gonadotrope pour stimuler la production cérébrale ou ovarienne de T et d'E₂.

Au niveau cérébral, nous constatons que ces récepteurs s'expriment dans les zones contenant le système à GnRH telles que le télencéphale avec l'aire pré-optique (*Cf. Chapitre II*; Lethimonier et al., 2004; Gopurappilly et al., 2013). Cette colocalisation d'expression est compatible avec l'idée que les récepteurs de la famille D₁ et D₂ pourraient être impliqués dans la régulation du système à GnRH. Cette dernière observation renforce notre hypothèse que le SCH peut agir au niveau cérébral pour réguler positivement le système GnRH lequel activerait ensuite l'axe hypophyse-ovaire pour induire l'augmentation des concentrations plasmatiques de T et d'E₂. Afin de confirmer et de préciser cette colocalisation d'expression des récepteurs de la DA, surtout les récepteurs de la famille D₁ avec le système GnRH, des

DISCUSSION GENERALE

analyses d'hybridation *in situ* ou d'immunohistochimie permettraient une colocalisation fine de chaque récepteur de la DA et de la GnRH au sein des différentes aires du cerveau comme cela a déjà été réalisé chez différentes espèces (Kapsimali et al., 2000a; Vacher et al., 2003; Lethimonier et al., 2004; Pasqualini et al., 2009; Gopurappilly et al., 2013).

Chez les téléostéens, de nombreuses études se sont intéressées aux sous-types de récepteurs D₂ et D₂₁ les montrant impliqués dans la régulation de l'axe gonadotrope (Dufour et al., 2010; Fontaine et al., 2013; Bryant et al., 2016; Jolly et al., 2016). Par exemple, en associant une méthode *in vivo* à de l'hybridation *in situ* et de l'immunofluorescence, Fontaine et al. (2013) ont suggéré que les récepteurs des sous-types D₂ et D₂₁ (anciennement D_{2a}, D_{2b} et D_{2c}) étaient tous impliqués dans l'inhibition dopaminergique exercée au niveau hypophysaire chez le poisson zèbre. En 2016, Jolly et ses collaborateurs se sont intéressés aux deux gènes paralogues codant pour les récepteurs D₂ (D_{2A} et D_{2B}) chez l'anguille d'Europe. Ils ont démontré que bien que les deux gènes soient exprimés au niveau hypophysaire, le récepteur codé par le gène D_{2B} serait celui principalement impliqué dans le contrôle dopaminergique des fonctions gonadotropes chez cette espèce (Jolly et al., 2016). Pour donner un dernier exemple, Bryant et al. (2016) ont montré que les récepteurs de la famille D₂ sont impliqués dans l'inhibition dopaminergique exercée sur le système à GnRH dans l'hypothalamus chez un cichlidé, *Astatotilapia burtoni*. Lors de notre étude du profil d'expression des récepteurs de la DA (Cf. Chapitre II), nous n'avons pas réussi à amplifier les gènes des récepteurs du sous-type D₂, celui qui serait le plus impliqué dans l'inhibition dopaminergique de l'axe gonadotrope. Ainsi, l'établissement du profil d'expression de ces récepteurs permettrait de fournir quelques indices pour comprendre leur implication dans le contrôle de l'axe gonadotrope et notamment dans la régulation du système à GnRH.

Dans tous les cas, cette localisation ubiquitaire des récepteurs de la DA suggère l'existence d'un système dopaminergique complexe aux trois niveaux de l'axe gonadotrope. Cependant, il ne permet pas d'éliminer certaines hypothèses concernant la mise en œuvre de la régulation *in vivo* de la stéroïdogénèse au travers des récepteurs de la famille D₁ (Cf. Chapitre I). Par la suite nous avons donc cherché à comprendre cette régulation *in vivo* de la stéroïdogénèse par le SCH en mettant en place un test biologique de culture *in vitro* des organes de l'axe gonadotrope, le cerveau et les ovaires (Cf. Chapitre III).

DISCUSSION GENERALE

2.4. Une étude *in vitro* pour comprendre les effets *in vivo*

Nous avons choisi de focaliser notre étude sur le cerveau et les ovaires car, à la différence de l'hypophyse pour lequel de nombreuses études convergent, peu d'informations sont disponibles concernant l'effet du système dopaminergique sur le système à GnRH cérébral et aucune sur la production ovarienne des stéroïdes sexuels. Ainsi, afin d'éclaircir nos hypothèses de départ qui proposent une action du SCH dans la stimulation de la sécrétion de GnRH au niveau cérébral et de la sécrétion de T et d'E₂ au niveau ovarien, chaque organe a été mis en culture et exposé à la DA, au SCH, à la MCP, ou à l'association de la DA avec l'un des deux antagonistes. Par cette analyse nous avons cherché à déterminer le rôle direct et local de la DA et de ses récepteurs dans la régulation du système GnRH et de la stéroïdogénèse ovarienne. Cette analyse pourrait notamment donner des pistes pour comprendre comment l'injection de SCH agit pour conduire à l'augmentation des concentrations plasmatiques des stéroïdes sexuels *in vivo*. A-t-elle agi uniquement au niveau cérébral ou directement au niveau des ovaires ? Pour répondre à cette question nous avons étudié l'effet de ces différentes molécules sur l'expression du gène de la GnRH-3 et de la LHβ dans le cerveau, et sur la production ovarienne des stéroïdes sexuels.

Au niveau cérébral, nous avons mis en évidence un effet de la MCP sur la chute de l'expression du gène de la GnRH-3 mais uniquement par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₂. Ces résultats sont en accord avec l'inhibition de l'axe gonadotrope par la voie dopaminergique au travers des récepteurs de cette famille (Dufour et al., 2010; Bryant et al., 2016). Toutefois, dans notre étude *in vitro*, nous n'avons pas montré d'effet de la DA sur l'expression du gène de la GnRH-3. Ces résultats soulèvent plusieurs questions. Est-ce que la DA a un effet sur le système à GnRH ? Si oui, est-ce que cette inhibition dopaminergique passe par l'intermédiaire d'autres molécules pour inhiber le système à GnRH ? Ou est-ce que cette forme de GnRH n'est pas impliquée dans la régulation dopaminergique ?

Par ailleurs, au niveau ovarien, nous avons mis en évidence que les deux familles de récepteurs sont impliquées dans la stimulation de la production de la T et de l'E₂. En effet, le blocage des deux familles de récepteurs limite la hausse de la production de ces stéroïdes sexuels induite par la dopamine. Toutefois, ces résultats sont en contradiction avec l'étude de Mori et al. (1994) qui ont montré que seuls les récepteurs de la famille D₁ sont impliqués dans l'activation de la stéroïdogénèse ovarienne chez le rat immature. A notre connaissance, chez

DISCUSSION GENERALE

les téléostéens, cette étude est la première à montrer une implication directe des deux familles de récepteurs dans la régulation de la stéroïdogenèse dans l'ovaire.

De façon inattendue, nous constatons que cette régulation ovarienne s'oppose aux résultats obtenus *in vivo*. En effet, lors de cette expérience, non seulement les niveaux plasmatiques de T et d'E₂ augmentaient suite à l'injection de SCH associée à la sGnRHa mais les récepteurs de la famille D₂ ne semblaient pas impliqués. Ainsi, comment expliquer ces apparentes contradictions entre nos deux expériences ?

2.5. Quelques hypothèses pour comprendre ces contradictions entre nos expériences *in vivo* et *in vitro*

Pour essayer de comprendre ces contradictions entre nos résultats *in vivo* et ceux obtenus *in vitro*, nous avons cherché à proposer un certain nombre d'hypothèses que nous vous exposons ci-dessous.

Premièrement, grâce à la culture *in vitro*, nous avons supprimé tous les effets qui seraient dus à des actions endocrines externes à notre test biologique. Ainsi, nous avons pu étudier les régulations directes et locales exercées par le système dopaminergique au niveau cérébral et au niveau des ovaires. Par conséquent, il est possible que lors de notre expérience *in vitro*, nous ayons exagéré un effet physiologique de la DA et/ou de ses récepteurs sur la production de T et d'E₂. Cet effet pourrait être masqué par les nombreuses régulations physiologiques existant à l'échelle de l'organisme entier (*in vivo*). Autrement dit, *in vivo*, le blocage ovarien des récepteurs de la DA suite à l'injection de SCH et MCP, se traduisant potentiellement par une inhibition de la stéroïdogenèse ovarienne (Cf. Chapitre III), n'aurait pas infléchi la hausse globale de la production des stéroïdes sexuels observée lors du Chapitre I.

Deuxièmement, nous pensons qu'*in vivo*, le SCH pourrait agir à un autre niveau de l'axe gonadotrope non étudié *in vitro*, notamment l'hypophyse. En effet, l'hypophyse est le lieu de synthèse d'un grand nombre d'hormones telles que les gonadotropines, la LH et la FSH qui sont responsables de la synthèse des stéroïdes sexuels. Chez un grand nombre de téléostéens, nous savons que l'hypophyse est le principal site d'action de l'inhibition dopaminergique par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₂ (Chang et al., 1990; Dufour et al., 2010). Il serait

DISCUSSION GENERALE

donc intéressant d'étudier si le blocage des récepteurs de la famille D₁ au niveau de l'hypophyse freine cette inhibition dopaminergique et provoque l'augmentation des stéroïdes sexuels. Ainsi, l'étude de l'effet de la DA et des différents antagonistes, notamment du SCH, sur l'expression du gène de la LH β dans l'hypophyse en culture permettrait : (1) de vérifier si la DA inhibe l'expression du gène de la LH β , (2) de déterminer si les récepteurs D₁ sont impliqués dans cette inhibition dopaminergique hypophysaire et (3) de savoir si les récepteurs D₂ sont les seuls impliqués chez le sandre comme déjà suggéré chez un certain nombre d'espèces. En complément, nous pourrions également étudier l'effet de la DA et des différents antagonistes sur la libération de la LH dans le milieu. Cette analyse *in vitro* pourrait s'accompagner d'une analyse *in vivo* au cours de laquelle seraient injectés la DA, la sGnRHa et les mêmes antagonistes, puis seraient prélevés les hypophyses, cerveaux et plasma afin de comprendre la cause de cette augmentation des stéroïdes sexuels. D'un autre côté, il serait intéressant d'étudier la GH. Cette hormone étant impliquée dans la stimulation de la production de T et d'E₂, et soumise à une stimulation par la DA et la GnRH, peut être que d'autres voies hypophysaires seraient responsables de cette augmentation des stéroïdes sexuels (Chang et al., 1990; Trudeau, 1997).

Troisièmement, cette augmentation maintenue des niveaux plasmatiques des stéroïdes sexuels *in vivo*, pourrait être liée au fait que le SCH a été injecté en combinaison avec une molécule de sGnRHa qui n'a pas été appliquée dans le cadre de notre étude *in vitro*. Malgré la présence des deux familles de récepteurs dans les ovaires, l'application *in vitro* des antagonistes des récepteurs de la famille D₁ et D₂, en présence ou non de DA, ne permet pas d'augmenter massivement les concentrations des stéroïdes sexuels comme nous l'avons observé lors de nos premières expériences *in vivo*. Il est possible que les effets du SCH sur l'activation de la stéroïdogénèse *in vivo* puissent seulement être mis en évidence quand l'axe gonadotrope est fortement activé.

Quatrièmement, l'effet du système dopaminergique sur certaines hormones de la reproduction n'a pas été étudié *in vitro* alors que ces dernières ont pu agir *in vivo* pour déclencher la stéroïdogénèse ovarienne. Par exemple, il est possible que la GnRH-1, plutôt que la GnRH-3, soit impliquée dans la régulation de l'activité hypophysaire et/ou soit la cible de la DA. En effet, chez les perciformes, deux autres formes de GnRH ont été identifiées, la GnRH-1 et la GnRH-2 (Lethimonier et al., 2004). D'ailleurs, les neurones hypothalamiques à

DISCUSSION GENERALE

GnRH-1 ont été montrés comme étant une cible de l'inhibition dopaminergique par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₂ (Bryant et al., 2016). De plus, la GnRH-1 fait partie des formes régulatrices de l'activité hypophysaire (Lethimonier et al., 2004) et donc potentiellement de la sécrétion des stéroïdes sexuels. Ainsi, l'étude de l'inhibition dopaminergique de l'expression du gène de la GnRH-1 serait probablement une bonne piste d'investigation à envisager pour comprendre l'effet du système dopaminergique et notamment des récepteurs de la famille D₁ sur le système à GnRH au niveau cérébral. Pour vérifier ces observations, il serait donc pertinent d'étudier le gène de la GnRH-1. D'un autre côté, certains auteurs ont également émis l'hypothèse que la GnRH-2 pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité hypophysaire notamment chez le sandre (Chang et al., 2009; Schaefer et Wuertz, 2016). Ainsi, l'étude de l'expression des gènes de la GnRH-1 et de la GnRH-2 dans des cerveaux issus d'une expérience *in vivo* et mis en culture dans les mêmes conditions permettrait de déterminer si la DA inhibe l'un des variants de la GnRH et par quels récepteurs. Serait-ce toujours les récepteurs de la famille D₂ (Cf. Chapitre 3 ; Bryant et al., 2016) ou est-ce que les récepteurs D₁ seraient également impliqués dans la régulation du système à GnRH (Yu et Peter, 1992)? Toutefois, la régulation de l'expression d'un gène ne signifie pas nécessairement que la protéine qui en est issue sera produite, active, libérée ou même régulée par la DA et les différents antagonistes. De notre point de vue, il est donc également important d'étudier l'effet de la DA (par l'utilisation d'un agoniste passant la barrière hémato-encéphalique) et des antagonistes D₁ et D₂ sur la libération des différents variants de la GnRH et sur l'activité des peptides.

Cinquièmement, l'étude d'autres paramètres physiologiques pourrait permettre de comprendre pourquoi le SCH augmente la production de T et d'E₂ *in vivo* alors que l'effet est contraire *in vitro* dans l'ovaire. Il serait intéressant d'étudier l'une des enzymes principalement impliquées dans les niveaux de production de la T et l'E₂, l'aromatase. En effet, comme nous l'avons énoncé au début de cette discussion, bien que le sens de la régulation nécessite d'être confirmé, il a été montré que la DA pouvait interagir avec le système aromatase au niveau de l'hypothalamus (Popescu et al., 2012; Xing et al., 2016). Cette même interaction entre la DA et le système aromatase existe sans doute également au niveau ovarien. En effet, la présence de catécholamines, dont la DA, a été rapportée dans l'ovaire du poisson-chat (Singh et al., 2010). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que le blocage des récepteurs D₁ dans l'ovaire a un effet sur l'activité aromatase opposé à celui observé dans le cerveau. Pour répondre à cette question,

DISCUSSION GENERALE

nous pourrions comparer les niveaux d'expression des gènes de cette enzyme ainsi que son activité au niveau cérébral et ovarien suite à une exposition *in vivo* et *in vitro* à un agoniste de la DA en présence ou non d'antagonistes.

Ainsi, grâce à l'ensemble de ces expériences, que cela soit au niveau hypophysaire, au niveau cérébral ou par l'étude de l'aromatase de façon *in vivo* ou *in vitro*, nous devrions être capables d'obtenir des réponses sur les questions suivantes : Pourquoi obtenons-nous une augmentation des stéroïdes sexuels *in vivo* lors de l'application d'un antagoniste de la famille D₁ alors que la DA provoque la même réponse *in vitro* notamment par l'intermédiaire de ce récepteur ? Pourquoi les récepteurs de la famille D₂ sont-ils impliqués *in vitro* dans la stéroïdogénèse et ne le sont plus *in vivo* ? Finalement, ils seraient également intéressant de chercher à comprendre pourquoi deux familles de récepteurs connues pour activer des voies de signalisation opposées (inhibition ou activation de l'adénylate cyclase par exemple) entraînent la même réponse *in vitro*. Ainsi, il serait important d'analyser la caractérisation fonctionnelle des récepteurs de la DA (expériences de liaison ligand-récepteur, libération d'AMPC). Par exemple, dans notre expérience *in vitro*, nous pourrions mesurer les concentrations d'AMPC libérées suite à l'exposition à de la DA.

Même si ces résultats *in vivo* et *in vitro* soulèvent encore beaucoup d'interrogations, il est primordial de déterminer si l'implication des récepteurs de la DA dans la régulation de l'axe gonadotrope s'accompagne d'un effet sur l'induction des phases finales de l'ovogenèse chez le sandre.

3. Implication des récepteurs de la DA lors des phases finales de l'ovogenèse

Lors des phases finales de la gamétogenèse, une hormone est essentielle pour l'induction de la maturation méiotique ovocytaire et l'ovulation. Cette hormone est le MIS pour *Maturation-Inducing Steroid*, considérée comme étant la DHP chez beaucoup d'espèces dont des perciformes (Nagahama et Yamashita, 2008). Dans toutes nos expériences, les deux études *in vivo* (*Chapitre I*) et notre étude *in vitro* (*Chapitre III*), la production de DHP, dont les concentrations étaient faibles, n'a jamais été régulée par l'un des antagonistes des récepteurs de la DA, la sGnRH α , la DA ou l'association de la DA à l'un des antagonistes. Chez le sandre,

DISCUSSION GENERALE

si on considère la DHP comme le MIS, cette absence de régulation par la DA ou l'un des antagonistes des récepteurs de la DA lors des phases finales pourrait s'expliquer par le fait qu'une faible inhibition dopaminergique existe chez cette espèce et ne bloquerait pas l'ovulation. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que d'autres molécules comme la 20β -S ou les corticostéroïdes soient impliquées dans l'induction des phases finales chez le sandre (Nagahama et Yamashita, 2008; Milla et al., 2009b). Dans le cadre d'une étude des phases finales de l'ovogenèse, il nous paraît important de connaître quelle(s) molécule(s) peut être considérée comme le MIS mais également sa cinétique de production. Ainsi, ces molécules devraient être dosées dans les milieux de culture et plasmas de l'ensemble de nos expériences afin d'éclaircir le rôle de la DA et de ses récepteurs sur l'activation des hormones stimulatrices pour déclencher les phases finales de l'ovogenèse chez le sandre.

Notre hypothèse que l'inhibition dopaminergique ne serait pas liée au blocage de l'ovulation du sandre est confortée par notre étude de l'induction de la maturation méiotique ovocytaire et de l'ovulation par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de la DA seuls. En effet, l'injection d'antagonistes des récepteurs de la famille D_1 mais également D_2 , seuls n'a permis ni d'induire la progression de la maturation méiotique ovocytaire ni l'ovulation (*Chapitre I*). Ces résultats sont en accord avec une étude chez la perche européenne qui a montré l'inefficacité de la MCP seule à déclencher l'ovulation (Ronyai et Lengyel, 2010). Lorsque ces molécules ont été associées avec une molécule de sGnRHa, ces traitements ont été capables d'induire l'ovulation de la même façon que la molécule de sGnRHa seule. En outre, ces antagonistes n'ont pas permis d'améliorer les performances reproductives (taux de fécondation, de survie et d'éclosion) par rapport à une injection de sGnRHa seule (*Chapitre I*). Ces résultats sont en accords avec l'étude de Zarski et al. (2013) qui ont montré que l'Ovopel qui combine une molécule de mGnRHa à la MCP, est capable d'induire l'ovulation. Ces antagonistes ne sont donc pas nécessaires pour l'induction des phases finales de l'ovogenèse du sandre. De plus, à la différence de ce qu'ont suggéré Zakes & Demska-Zakes (2005), ces antagonistes n'auraient pas d'effets négatifs sur les performances de reproduction du sandre.

Bien qu'un rôle des récepteurs de la DA soit démontré dans la régulation de la stéroïdogénèse et notamment dans la production de T suite à l'action de la DA, celle-ci ne semble pas impliquée dans l'induction des phases finales de l'ovogenèse du sandre (*Cf. Chapitres I et III*). Comme cela a été suggéré chez certaines espèces, il est possible que la DA

DISCUSSION GENERALE

soit impliquée plus tôt dans le déroulement de l'ovogenèse et notamment au cours de la vitellogenèse (Vacher et al., 2002; Aizen et al., 2005; Dufour et al., 2010). En effet, au regard des stéroïdes sexuels qui sont régulés, la T et l'E₂ et au fait que l'hormone de maturation ne soit pas régulée, nous penserions à un rôle plus précoce lors du cycle de reproduction. En dehors de la fonction de reproduction, on peut également envisager un rôle de la DA dans d'autres fonctions physiologiques chez le sandre. En effet, la DA est impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques chez les vertébrés et la présence des récepteurs D_{1Aa} et D₃ dans le cœur ou du récepteur D₃ dans les branchies nous laisse penser que la DA pourrait être impliquée dans les fonctions respiratoire ou circulatoire par l'intermédiaire de l'un de ces récepteurs. Bien sûr, compte tenu de l'expression ubiquitaire des récepteurs dopaminergiques dans l'ensemble du cerveau, d'autres fonctions comme la mémoire ou la locomotion peuvent être proposées (Mok et Munro, 1998; Portavella et al., 2004; Hamilton et al., 2017). Par exemple, une étude a montré que la DA, par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₁, est impliquée dans la régulation positive de la locomotion. Ces auteurs indiquent que le télencéphale serait la cible de cette innervation dopaminergique (Mok et Munro, 1998). Ainsi, la présence de l'ensemble de nos récepteurs et notamment les récepteurs D_{1A} dans le télencéphale (*Cf. Chapitre II*) ne permet pas d'écarter l'hypothèse d'une implication dans l'activité locomotrice.

4. Les limites de notre étude

Notre étude présente toutefois des limites que nous ne pouvons pas ignorer. Par exemple, le nombre d'individus utilisés pour chaque expérience, les caractéristiques intrinsèques variables de nos populations, le contrôle ou non des paramètres environnementaux, le choix des molécules à utiliser, les stades de maturation ainsi que le nombre de prélèvements opérés sont autant de facteurs qui peuvent avoir influencé nos résultats et qu'il faut prendre en compte dans chaque interprétation. Ces limites ont été séparées en deux grandes catégories, les facteurs populationnels que nous commencerons par présenter, et les facteurs méthodologiques.

4.1. Les facteurs populationnels

Pour l'essentiel de notre étude, nous avons choisi de n'utiliser que des lots de sandre issus d'étangs de République Tchèque afin de limiter la variabilité inter-populationnelle liée à l'origine des poissons (Lappalainen et al., 2003). Toutefois, compte tenu de leur caractère « pseudo-sauvage », notre capacité à obtenir un nombre suffisant de femelles de sandre et au

DISCUSSION GENERALE

même stade de maturation méiotique ovocytaire s'est avérée difficile nécessitant une adaptation perpétuelle du dispositif expérimental (Żarski et al., 2012a). Afin d'essayer d'éviter ce biais nous aurions pu choisir des populations issues d'élevages en circuit fermé. Toutefois, ceci aurait apporté des biais supplémentaires à notre étude car les mécanismes endocriniens de la reproduction de ces populations captives diffèrent de ceux observés chez cette population élevée dans des conditions semi-naturelles dans des étangs de pisciculture (Khendek et al., 2018). Ainsi, afin de limiter la variabilité inter-individuelle qui serait due à l'utilisation de femelles à des stades de maturation ovocytaire différents, chaque stade a été pris en compte dans les analyses statistiques en tant que facteur aléatoire explicatif.

Dans le cadre de notre expérience menée au sein d'une entreprise aquacole, nous sommes conscients que le lot de femelles utilisées étaient maintenues dans des conditions environnementales contrôlées depuis quelques années, à la différence des femelles de notre expérience préliminaire (Station expérimentale de la Bouzule) qui ont été maintenues dans des conditions naturelles (température et photopériode) afin de limiter au maximum le stress induit par un changement de leurs conditions environnementales (*Cf. Chapitre I*). Dans le cas d'injections de traitements hormonaux, le plus important était que l'ensemble des individus constituant le lot de géniteurs utilisés ait la même origine et à peu près le même vécu afin d'obtenir des résultats comparables entre les groupes expérimentaux. Dans chacune de nos expériences, ces paramètres ont été respectés.

Les conditions pré-expérimentales peuvent toutefois également jouer un rôle non négligeable dans l'interprétation de nos résultats. En effet, bien que l'ensemble de nos femelles proviennent d'étangs de République Tchèque, certains lots ont été transportés dans nos structures expérimentales (Station expérimentale de la Bouzule/Plateforme d'Expérimentation en Aquaculture (PEA)) peu de temps avant l'expérience. Ces femelles de sandre ont donc été soumises au stress dû au transport ainsi qu'à un changement d'environnement (transfert d'un étang vers un bassin de quelques m³, accessibilité à la nourriture) auquel les femelles de l'entreprise aquacole n'ont pas été soumises (*Cf. Chapitre I*).

Lors de nos expériences *in vivo*, d'autres facteurs peuvent apporter un biais à nos résultats dont nous sommes pleinement conscients.

Par exemple, la charge et/ou la densité de géniteurs sont des facteurs susceptibles d'interférer avec les réponses hormonales (Li et al., 2012). Lors de notre expérience préliminaire nous avons environ 2,5 kg/m³ alors que lors de notre expérience en entreprise

DISCUSSION GENERALE

aquacole nous avons un peu moins de 25 kg/m³. Cette différence de charge est liée à une modification potentielle des interactions sociales entre les individus ou du niveau de stress des géniteurs, pouvant en retour perturber la réceptivité cérébrale ou ovarienne à des agents endocriniens.

Le sex-ratio est un autre facteur populationnel potentiellement important pour la répétabilité des résultats expérimentaux (Kappus et Fong, 2014). Lors de notre expérience préliminaire, nous n'avons utilisé que des femelles alors que pour notre seconde expérience des mâles étaient présents (*Cf. Chapitre I*). Dans le cas de cette dernière expérience, les bassins d'élevage réservés aux sandres sont tous reliés par un même flux d'eau rendant impossible la mise de côté des mâles. Nous pouvons donc nous poser la question de l'effet de la transmission de phéromones entre les deux sexes sur la réponse hormonale.

Enfin, le poids et l'âge des individus utilisés doivent également être pris en compte car l'âge, le nombre de saisons de reproduction ou le facteur de condition de la femelle influent sur les performances de reproduction de l'individu (Jokthan, 2013; Dadras et al., 2017). Dans le cas de nos expériences, nous avons utilisé des poissons entre 3 et 4 ans pour notre expérience préliminaire et notre expérience *in vitro* et entre 4 et 5 ans pour notre seconde expérience (*Cf. Chapitres I et II*). Ces femelles étaient donc sexuellement matures mais leur âge n'était pas strictement identique. Nous ne pouvons pas définitivement exclure un biais de l'âge dans le niveau des hormones de reproduction et dans la réponse aux traitements.

4.2. Les facteurs méthodologiques

Parmi ces facteurs nous retrouvons le choix des antagonistes utilisés notamment ceux spécifiques des récepteurs de la famille D₂. Dans le cadre de cette thèse, bien que d'autres antagonistes existent et soient utilisés en pisciculture (PIM, DOM), nous avons choisi d'utiliser la MCP. En effet, c'est un antagoniste constitutif de l'Ovopel qui est une préparation commerciale déjà étudiée chez le sandre mais dont l'efficacité pour induire l'ovulation est contradictoire (Zakes et Demska-Zakes, 2005; Źarski et al., 2013). Il serait donc intéressant de répéter ces expériences avec d'autres antagonistes. Par exemple, nous pourrions utiliser le PIM, la DOM ne passant pas la barrière hémato-encéphalique (Barone, 1999; Reddymasu et al., 2007). En effet, le PIM semble être plus efficace que la MCP pour induire l'ovulation en stimulant l'axe gonadotrope et notamment la réponse des gonadotropines chez le poisson rouge (Treves-Brown, 2000)

DISCUSSION GENERALE

Les doses utilisées ainsi que les temps de prélèvement peuvent également constituer des biais à nos interprétations.

Pour les tests *in vitro*, nous avons choisi d'utiliser la DA, le ligand naturel des récepteurs de la DA (affinité de l'ordre du micromolaire pour la famille D₁ et du nanomolaire pour la famille D₂, Le Crom, 2000) afin d'être au plus près de la situation physiologique. L'absence d'effets marquants de cette molécule peut être due à un nombre d'individus insuffisant ou à l'utilisation de doses inappropriées. Compte tenu de l'absence de données sur la DA chez le sandre, nous avons initialement choisi d'étudier l'effet de cinq doses de DA (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 μ M). Pour des raisons expérimentales, nous avons choisi de n'étudier que les trois doses intermédiaires sachant que la dose à 10 μ M avait déjà démontré son efficacité sur la libération de GnRH (Yu et al., 1991; Yu et Peter, 1992; Bryant et al., 2016). L'ajout d'une dose plus forte serait donc une possibilité pour de prochaines expériences même si un effet pharmacologique toxique peut être à craindre avec de si fortes doses.

Le sandre est un poisson extrêmement stressé qu'il faut éviter de trop manipuler surtout lorsqu'on se rapproche de l'ovulation. A chaque prélèvement, le sang étant prélevé sur la même femelle, nous avons dû limiter le nombre de prélèvements au risque de perdre des informations sur le profil de réponse temporelle des individus suite à l'injection hormonale. Chez le sandre, aucune information sur les variations des niveaux de stéroïdes sexuels au cours des phases finales n'est disponible. Ainsi, travailler avec des temps de prélèvement plus fréquents auraient permis d'obtenir une cinétique des niveaux hormonaux et donc de préciser davantage leur importance relative au cours des phases pré-ovulatoires.

Dans le cadre de notre expérience *in vitro*, nous avons initialement choisi d'effectuer une incubation de nos tissus pendant au moins 12h. Pour des raisons expérimentales, nous avons décidé de réduire ce temps à 8h qui constitue un temps suffisant pour induire la transcription d'un gène (Klenke, 2006; Zmora et al., 2015). Il est néanmoins envisageable qu'une exposition plus longue des tissus aux traitements aurait pu engendrer une amplitude de réponse supérieure.

Pour terminer, d'autres facteurs tels que le mode d'admission, l'absence de dosage de certaines molécules et de caractérisation fonctionnelle des récepteurs dopaminergiques peuvent être discutés.

Au cours de notre étude, nous avons choisi d'injecter en une seule fois chaque molécule afin de rester au plus près des pratiques aquacoles pour cette espèce. Or, le problème de l'injection est que l'efficacité est dépendante de la demi-vie de la molécule. L'une des

DISCUSSION GENERALE

alternatives à l'injection est la mise en place d'implants sous-cutanés qui libèrent de façon chronique la molécule dans le sang permettant ainsi une efficacité sur du plus long terme. Ce mode d'administration permet également d'éviter le stress de l'individu lorsque celui-ci doit être injecté plusieurs fois. Il est donc également envisageable que l'utilisation d'implants contenant de la DA ou des antagonistes des récepteurs aurait mené à des interprétations différentes.

Ensuite, certaines molécules comme la LH, la 20β -S et les corticostéroïdes n'ont pas été dosées au cours de cette étude. L'absence d'anticorps spécifique chez le sandre nous a empêché de doser la LH dans le plasma suite aux différents traitements hormonaux. De plus, le dosage de la 20β -S et de certains corticostéroïdes auraient permis d'avoir une idée plus précise du/des MIS présents chez le sandre et de déterminer si la DA n'a vraiment aucun effet sur la sécrétion de cette hormone et l'induction des phases finales.

Pour finir, une limite qui pourrait s'avérer importante pour notre étude est l'absence de caractérisation complète (moléculaire et fonctionnelle) des récepteurs de la DA. En effet, l'obtention de séquences complètes des récepteurs D_{1Ba} et D_{1Cb} mais surtout la validation de la spécificité des antagonistes utilisés, le SCH et la MCP notamment par le dosage de l'AMPC libérée suite à leur application permettrait de confirmer que la variation des concentrations de stéroïdes sexuels se fait bien par l'intermédiaire de ces deux familles de récepteurs (*Chapitre I et III*).

**CONCLUSIONS &
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Dans le cadre du développement d'une aquaculture durable par la domestication de nouvelles espèces, le sandre apparaît comme une espèce intéressante. Toutefois, le développement et la pérennisation de sa production aquacole nécessite la compréhension et la maîtrise de sa reproduction. Chez de nombreuses espèces de téléostéens, le système dopaminergique agit comme inhibiteur de cette reproduction en limitant la libération de LH et en bloquant l'ovulation. Ainsi, dans l'objectif d'optimiser cette production aquacole du sandre, nous nous sommes intéressés à l'implication du système dopaminergique et notamment des récepteurs de la DA dans la reproduction du sandre.

Grâce à cette étude nous avons montré que :

- (1) Les deux familles de récepteurs de la DA sont impliquées dans la régulation de l'axe gonadotrope. La famille D₂ est impliquée dans la régulation négative de la synthèse de GnRH-3 et les familles D₁ et D₂ dans la stimulation de la production des stéroïdes sexuels, la T et l'E₂. Toutefois, les mécanismes responsables de cette régulation restant encore peu clairs et nécessiteraient des investigations supplémentaires.
- (2) Le blocage des récepteurs de la DA n'est pas nécessaire pour l'induction de la maturation méiotique ovocytaire et l'ovulation. Ces résultats ne sont pas en faveur de l'existence d'une inhibition, même faible, de la voie dopaminergique sur les mécanismes de déclenchement des phases finales de l'ovogenèse.

Dans le cadre du projet Eurostars, nous pouvons conclure que l'utilisation de traitements hormonaux à base d'antagonistes des récepteurs de la DA n'est pas nécessaire pour déclencher et induire la progression des phases finales de l'ovogenèse chez le sandre. La mise au point d'autres méthodes d'optimisation sera nécessaire pour continuer à développer la production aquacole du sandre. Par exemple, il serait intéressant d'optimiser l'utilisation seule de la GnRH_a qui reste pour l'instant avec l'hCG le traitement le plus efficace pour l'induction de l'ovulation chez le sandre. Cette optimisation passerait par le choix : de l'analogue de la GnRH à utiliser (sGnRH_a vs mGnRH_a), de la dose optimale à appliquer, de la voie d'administration à emprunter (injection vs implant) mais également du stade de maturation

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

optimal pour obtenir les meilleures performances reproductives (taux d'ovulation, taux de survie embryonnaire et d'éclosion, faible taux de déformations...).

Bien sûr, d'un point de vue fondamental, l'étude du rôle et des mécanismes d'action d'autres molécules qui seraient impliquées dans la régulation de la fonction de reproduction chez les poissons téléostéens pourrait contribuer à optimiser la production aquacole du sandre. Pour donner un exemple, comme nous l'avons vu précédemment, un autre neuropeptide est étudié depuis plusieurs années, la GnIH. Le complexe GnIH/récepteur (GnIHR) est présent chez de nombreux vertébrés dont certains téléostéens. De façon similaire à la DA, cette molécule agit au niveau hypophysaire pour réguler la production et la libération des gonadotropines (Qi et al., 2013; Biran et al., 2014). Toutefois, compte tenu de la diversité des stratégies reproductives, le rôle et les mécanismes d'action des différentes formes de GnIH restent à être éclaircis chez les téléostéens (Ogawa et Parhar, 2014). Bien que le rôle de ce système à GnIH soit encore inconnu pour induire l'ovulation, l'étude de cette molécule semble être intéressante. Bien sûr, d'autres molécules d'intérêts telles que les kisspeptines ou la mélatonine, pourraient être étudiées afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la reproduction chez le sandre.

Quoi qu'il en soit, l'utilisation et la mise sur le marché de tout traitement hormonal devrait être précédée d'analyses approfondies en laboratoire afin de comprendre les effets de chaque composant sur la physiologie du poisson. En effet, l'Ovopel, parmi d'autres traitements, a largement été utilisé chez le sandre et montrait des effets contradictoires selon les études. Toutefois, aucune étude ne s'est intéressée à savoir si l'utilisation de la MCP était nécessaire chez cette espèce et si elle ne risquait pas d'induire des effets rebonds qui pourraient être indésirables pour la reproduction ou même le bien-être de l'espèce. Au vu des résultats de cette thèse, il me paraît nécessaire de comprendre le mode d'action ainsi que les effets (physiologiques, comportementaux) engendrés par une molécule avant son utilisation en routine dans le cadre des pratiques aquacoles.

**LISTE DES TABLEAUX
& FIGURES**

LISTE DES TABLEAUX & FIGURES

Cette liste comprend l'ensemble des Tableaux et Figures présentés dans l'introduction de ce manuscrit.

Tableaux

Tableau 1 : Pêcheries mondiales et production aquacole et utilisation (million de tonnes, d'après la FAO, 2012, 2018a).

Tableau 2 : Séquences protéiques des différentes formes de GnRH identifiées chez les vertébrés (d'après Lethimonier et al., 2004).

Figures

Figure 1 : Production mondiale de l'aquaculture et des pêches (en millions de tonnes ; d'après la FAO, 2018a).

Figure 2 : Production mondiale (en tonnes) du sandre issue de (A) l'aquaculture et de (B) la pêche (source : FAO FISHSTAT dans FAO, 2018b).

Figure 3 : Aire de répartition du Sandre dans le monde (d'après Stepien et Haponski, 2015).

Figure 4 : Variations annuelles du Rapport Gonado-Somatique (RGS ; %) chez les femelles de sandres, et de la température de l'eau (°C) observées en Camargue. Les différentes étapes du cycle sexuel sont indiquées (d'après Poulet, 2004).

Figure 5 : Les stades de maturation observés lors des phases finales de l'ovogénèse chez le sandre : I à VI illustrent l'avancée de la maturation méiotique ovocytaire et VII l'ovulation (modifié d'après Zarski et al., 2012a).

Figure 6 : Les différentes voies de biosynthèse des stéroïdes sexuels dans les gonades des téléostéens. P450scc, P450 side-chain cleavage ; 3 β -HSD, 3 β -hydroxysteroid deshydrogenase ; P450c17, cytochrome P450 17-hydroxylase ; 17 β -HSD, 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase ; 20 β -HSD, 20 β -hydroxysteroid deshydrogenase ; P450arom, P450 aromatase (Lubzens et al., 2010).

Figure 7 : Voie de biosynthèse et d'activation du MPF (Maturation Promoting Factor) suite à la fixation du MIS (MIH, Maturation-Induced-Steroid/Hormone) sur son récepteur (d'après Nagahama et Yamamoto, 2008).

Figure 8 : Régulation de la gamétogénèse par l'axe gonadotrope et notamment les gonadotropines a) lors de la vitellogénèse et b) lors des phases finales. DA, dopamine ; GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone ; FSH, Follicle Stimulatine Hormone ; LH, Luteinizing

LISTE DES TABLEAUX & FIGURES

Hormone ; MPF, Maturation Promoting Factor ; MIS Maturation-Induced-Steroid (d'après Yaron et Levavi-Sivan, 2011).

Figure 9 : Principales étapes du processus de maturation des molécules de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). GAP, GnRH-Associated Peptide (schéma personnel).

Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par les molécules de GnRH au sein des cellules gonadotropes du poisson rouge. AA, Acide arachidonique ; AC, Adénylate Cyclase ; CaM, Calmodulines ; cAMP, cyclic Adenosine MonoPhosphate ; DAG, Diacylglycérol ; s ou cGnRH, salmon ou chicken Gonatropin Releasing Hormone ; GTH-II, Gonadotropin hormones II (LH) ; InsP, Inositol trisphosphate ; PKA, Protéine Kinase A ; PKC, Protéine Kinase C ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; PLC, Phospholipase C (d'après Chang et al., 2000).

Figure 11 : Voies de biosynthèse, de libération et du catabolisme de la dopamine. L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine ; DAT : Transporteur de la dopamine (modifiée d'après Ben-Jonathan et Hnasko, 2001).

Figure 12 : Comparaison des différences générales dans la structure protéique des deux familles de récepteurs D₁ (D1-type) et D₂ (D2-type) de la dopamine chez les vertébrés (d'après Pandey et al., 2013).

Figure 13 : Exemples de voies de signalisation régulées par les familles de récepteurs de la dopamine D₁ et D₂. AC, Adénylate Cyclase ; PLC, phospholipase C (d'après Missale et al., 1998).

Figure 14 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation régulées par l'inhibition dopaminergique au travers des récepteurs D₂ sur la libération basale de LH ou après la stimulation par une molécule de GnRH dans les cellules gonadotropes du poisson rouge, *Carassius auratus*. AA, Acide arachidonique ; AC, Adénylate Cyclase ; CAM, Calmodulines ; cAMP, cyclic Adenosine MonoPhosphate ; GTH-II, Gonadotropin hormone II (LH) ; InsP, Inositol trisphosphate ; PKA, Protéine Kinase A ; PKC, Protéine Kinase C ; PLA₂, Phospholipase A₂ ; PLC, Phospholipase C ; VSCC, Voltage Sensitive Calcium Channels (d'après Chang et al., 2000).

Figure 15 : Voies de biosynthèse des stéroïdes sexuels impliqués dans la production de la 17 β -Estradiol (vitellogenèse) et la 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation méiotique ovocytaire) dans les ovaires de téléostéens. P450scc, P450 side-chain cleavage ; P450c17, Cytochrome P450c17 avec une activité 17 α -hydroxylase (1) et une activité 17,20-lyase (2) ; 3 β -HSD, 3 β hydroxysteroid deshydrogenase ; 17 β -HSD, 17 β hydroxysteroid deshydrogenase ; 20 β -HSD, 20 β hydroxysteroïde deshydrogenase ; P450arom, P450 aromatase (modifiée d'après Nagahama et Yamashita, 2008).

LISTE DES ESPECES

LISTE DES ESPECES

LISTE DES ESPECES

Cette liste d'espèces comprend les espèces citées dans l'introduction, la discussion et la conclusion de ce manuscrit. Les noms sont issus de Fishbase (2018) : les noms sont ceux proposés par la FAO, puis ceux proposés par la société américaine des pêches (AFS) et enfin les noms les plus répandus (Français/Anglais).

Noms scientifiques	Noms vernaculaires (Français/Anglais)
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguille d'Europe/European eel
<i>Anguilla australis</i>	Anguille d'Australie/Short-finned eel
<i>Anguilla japonica</i>	Anguille du Japon/Japanese eel
<i>Astatotilapia burtoni</i>	-/-
<i>Carassius auratus</i>	Poisson rouge/Goldfish
<i>Carassius carassius</i>	Carassin/Crucian carp
<i>Clarias gariepinus</i>	Poisson-chat nord-africain/North african catfish
<i>Cynoscion nebulosus</i>	Acoupa pintade/Spotted weakfish
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune/Common carp
<i>Danio rerio</i>	Poisson Zèbre/Zebrafish
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar européen/European seabass
<i>Epinephelus coioides</i>	Mérou à tâches orange/Orange-spotted grouper
<i>Esox lucius</i>	Brochet/Northern pike
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Choquemort/Mummichog
<i>Heteropneustes fossilis</i>	-/Stinging catfish
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Carpe argentée/Silver carp
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Carpe à grosse tête/Bighead carp
<i>Micropogonias undulatus</i>	Tambour brésilien/Atlantic croaker
<i>Morone americana</i>	Bar blanc d'Amérique/White perch
<i>Morone chrysops</i>	Bar blanc/White bass
<i>Morone saxatilis</i>	Bar d'Amérique/Striped bass
<i>Mugil cephalus</i>	Mulet cabot/Flathead grey mullet
<i>Oncorhynchus masou</i>	Saumon du Japon/Masu salmon
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel/Rainbow trout
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Saumon rouge/Sockeye salmon
<i>Oreochromis aureus</i>	-/Blue tilapia
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia du Nil/Nile tilapia
<i>Pagrus major</i>	Dorade japonaise/Red seabream
<i>Perca flavescens</i>	Perchaude/American yellow perch
<i>Perca fluviatilis</i>	Perche européenne/European perch
<i>Plecoglossus altivelis</i>	Ayu/Ayu sweetfish
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat/Rat
<i>Salmo trutta</i>	Truite de mer/Sea trout
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Saumon de fontaine/Brook trout
<i>Sander lucioperca</i>	Sandre/Pikeperch
<i>Sander vitreus</i>	Sandre américain/Walleye
<i>Solea senegalensis</i>	Sole sénégalaise/Senegalese sole
<i>Sparus aurata</i>	Dorade (royale) /Gilthead seabream (seabream)
<i>Tinca tinca</i>	Tanche/Tench
<i>Xenopus laevis</i>	Xénope/Xenopus

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B et Rosenfeld H 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 142, 212–221.
- Amano M, Iigo M, Ikuta K, Kitamura S, Okuzawa K, Yamada H et Yamamori K 2004. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zoological Science* 21, 79–85.
- Amano M, Moriyama S, Iigo M, Kitamura S, Amiya N, Yamamori K, Ukena K et Tsutsui K 2006. Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. *Journal of Endocrinology* 188, 417–423.
- Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE et Caron MG 1990. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *TiPS* 11, 231–236.
- Anglade I, Wang Y, Jensen J, Tramu G, Kah O et Conlon JM 1994. Characterization of trout galanin and its distribution in trout brain and pituitary. *Journal of Comparative Neurology* 350, 63–74.
- Asanuma H, Ohashi H, Matsubara H, Ijiri S, Matsubara T, Todo T, Adachi S et Yamauchi K 2003. 11-ketotestosterone potentiates estrogen-induced vitellogenin production in liver of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 383–384.
- Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M et Zanuy S 2000. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology* 56, 1155–1172.
- Barone JA 1999. Domperidone: a peripherally acting dopamine₂-receptor antagonist. *The Annals of Pharmacotherapy* 33, 429–439.
- Barry TP, Malison JA, Lapp AF et Procarione LS 1995. Effects of selected hormones and male cohorts on final oocyte maturation, ovulation, and steroid production in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture* 138, 331–347.
- Ben Ammar I, Teletchea F, Milla S, Ndiaye WN, Ledoré Y, Missaoui H et Fontaine P 2015. Continuous lighting inhibits the onset of reproductive cycle in pikeperch males and females. *Fish Physiology and Biochemistry* 41, 345–356.
- Ben-Jonathan N et Hnasko R 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews* 22, 724–763.
- Biran J, Golan M, Mizrahi N, Ogawa S, Parhar IS et Levavi-Sivan B 2014. LPXR_{Fa}, the piscine ortholog of GnIH, and LPXR_F receptor positively regulate gonadotropin secretion in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Endocrinology* 155, 4391–4401.
- Bobe J, Montfort J, Nguyen T et Fostier A 2006. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 39.
- Boehmler W, Carr T, Thisse C, Thisse B, Canfield VA et Levenson R 2007. D4 dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes, Brain and Behavior* 6, 155–166.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B et Levenson R 2004. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental Dynamics* 230, 481–493.
- Borg B 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109C, 219–245.
- Bruslé J et Quignard JP 2001. *Biologie des poissons d'eau douce européens*. Technique et Documentation, Paris. pp 625.
- Bryant AS, Greenwood AK, Juntti SA, Byrne AE et Fernald RD 2016. Dopaminergic inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Journal of Experimental Biology. 219, 3861-3865.
- Callier S, Snappyan M, Crom S, Prou D, Vincent J-D et Vernier P 2003. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biology of the Cell* 95, 489–502.
- Canosa LF, Chang JP et Peter RE 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology* 151, 1–26.
- Cardinaud B, Sugamori KS, Coudouel S, Vincent J-D, Niznik HB et Vernier P 1997. Early emergence of three dopamine D1 receptor subtypes in vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 2778–2787.
- Carnevali O, Carletta R, Cambi A, Vita A et Bromage N 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biology of reproduction* 60, 140–146.
- Cejko BI, Targońska K, Kowalski RK, Zarski D, Sarosiek B, Kucharczyk D et Glogowski J 2012. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology* 28, 873–877.
- Cejko BI et Kucharczyk D 2015. Application of dopaminergic antagonist: Metoclopramide, in reproduction of crucian carp *Carassius carassius* (L.) under controlled conditions. *Animal Reproduction Science* 160, 74–81.
- Chang JP et Peter RE 1983. Effects of pimozide and des Gly10, [d-Ala6]luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration, and ovulation in female goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 52, 30–37.
- Chang JP, Yu KL, Wong AOL et Peter RE 1990. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. *Neuroendocrinology* 51, 661–674.
- Chang JP, Wong AOL, Van Der Kraak G et Van Goor F 1992. Relationship between cyclic AMP-stimulated and native gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 86, 359–377.
- Chang JP, Van Goor F, Jobin RM et Lo A 1996. GnRH signaling in goldfish pituitary cells. *Biological Signals* 5, 70–80.
- Chang JP, Johnson JD, Van Goor F, Wong CJH, Yunker WK, Uretsky AD, Taylor D, Jobin RM, Wong AOL et Goldberg JI 2000. Signal transduction mechanisms mediating secretion in goldfish gonadotropes and somatotropes. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie and Biologie Cellulaire* 78, 139–153.
- Chang JP, Johnson JD, Sawisky GR, Grey CL, Mitchell G, Booth M, Volk MM, Parks SK, Thompson E, Goss GG, Klausen C et Habibi HR 2009. Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts—studies on the goldfish model. *General and Comparative Endocrinology* 161, 42–52.
- Chaube R et Joy KP 2002. Effects of altered photoperiod and temperature, serotonin-affecting drugs, and melatonin on brain tyrosine hydroxylase activity in female catfish, *Heteropneustes fossilis*: a study correlating ovarian activity changes. *Journal of Experimental Zoology* 293, 585–593.
- Chaube R, Singh RK et Joy KP 2014. Effects of ovaprim, a commercial spawning inducer, on vasotocin and steroid hormone profiles in the catfish *Heteropneustes fossilis*: *in vivo* and *in vitro* studies. *General and Comparative Endocrinology* 195, 190–200.
- Ciereszko RE, Dabrowski K, Ciereszko A, Ebeling J et Ottobre JS 1997. Effects of temperature and photoperiod on reproduction of female yellow perch *Perca flavescens*: plasma concentrations of steroid hormones, spontaneous and induced ovulation, and quality of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- eggs. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 344–356.
- Clelland E et Peng C 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312, 42–52.
- Copeland PA et Thomas P 1989. Control of gonadotropin release in the atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 74, 474–483.
- Crim LW et Evans DM 1979. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile Rainow trout (*Salmo Gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology* 37, 192–196.
- Dadras H, Golpour A, Zahmatkesh M, Khara H, Noveiri SB et Siddique MAM 2017. Effects of age on the reproductive performance of different males and females in bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* (Richardson, 1845). *Comparative Clinical Pathology* 26, 1165–1171.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD et Seeburg PH 1989. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *The EMBO Journal* 8, 4025–4034.
- Demchyshyn LL, Sugamori KS, Lee FJ, Hamadanizadeh SA et Niznik HB 1995. The dopamine D1D receptor. Cloning and characterization of three pharmacologically distinct D1-like receptors from *Gallus domesticus*. *The Journal of biological chemistry* 270, 4005–4012.
- Devlin RH et Nagahama Y 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- Diotel N, Le Page Y, Mouriec K, Tong SK, Pellegrini E, Vaillant C, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Chung BC et Kah O 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 172–192.
- Donaldson EM et Hunter GA 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. *Fish Physiology* 9, 351–403.
- Drori S, Ofir M, Levavi-Sivan B et Yaron Z 1994. Spawning induction in common carp (*Cyprinus carpio*) using pituitary extract or GnRH superactive analogue combined with metoclopramide: analysis of hormone profile, progress of oocyte maturation and dependence on temperature. *Aquaculture* 119, 393–407.
- Dufour S, Weltzien F-A, Sebert M-E, Le Belle N, Vidal B, Vernier P et Pasqualini C 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040, 9–21.
- Dufour S, Sebert ME, Weltzien FA, Rousseau K et Pasqualini C 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology* 76, 129–160.
- Espey LL 1980. Ovulation as an inflammatory reaction-A hypothesis. *Biology of Reproduction* 22, 73–106.
- Falahatkar B et Poursaeid S 2014. Effects of hormonal manipulation on stress responses in male and female broodstocks of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture International* 22, 235–244.
- FAO 2012. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Rome. pp 209
- FAO 2018a. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. pp 227
- FAO 2018b. (2012-2018) Cultured aquatic species information programme. sander lucioperca. cultured aquatic species information programme. Texte par Zakęs, Z. Dans: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 1 January 2012. [Cited 3 October 2018].
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M et Gómez A 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Endocrinology 312, 61–71.
- Finn RN, Ostby GC, Norberg B et Fyhn HJ 2002. *In vivo* oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. *The Journal of Experimental Biology* 205, 211–224.
- Fontaine P 2009. Développement de la pisciculture continentale européenne et domestication de nouvelles espèces. *Cahiers Agricultures* 18, 144–147.
- Fontaine P, Legendre M, Vanderputte M et Fostier A 2009. Domestication de nouvelles espèces et développement durable de la pisciculture. *Cahiers Agricultures* 18, 393–401.
- Fontaine P, Wang N et Hermelink B 2015. Broodstock management and control of the reproductive cycle. Dans *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices* (eds. P Kestemont, K Dabrowski et RC Summerfelt), pp. 103–122. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Fontaine R, Affaticati P, Yamamoto K, Jolly C, Bureau C, Baloché S, Gonnet F, Vernier P, Dufour S et Pasqualini C 2013. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D2 receptor subtypes. *Endocrinology* 154, 807–818.
- Fontenele O 1955. Injecting pituitary (hypophyseal) hormones into fish to induce spawning. *The Progressive Fish-Culturist* 17, 71–75.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B et Zohar Y 1983. The gonadal steroids. Dans *Fish Physiology Vol. 9, Part A* (eds. WS Hoar, DJ Randall et EM Donaldson), pp. 277–372. Academic Press Inc, Cambridge, Massachusetts, Etats-Unis.
- Fostier A et Jalabert B 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and *in vivo* and *in vitro* responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology and Biochemistry* 2, 1–4.
- Fostier A et Jalabert B 2004. Domestication et reproduction chez les poissons. *INRA Productions Animales* 17, 199–204.
- García-Hernández MP, Koide Y, Díaz MV et Kawauchi H 1997. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of mediterranean yellowtail, *seriola dumerilii* (Risso, 1810). *General and Comparative Endocrinology* 106, 389–399.
- Ge W, Chang JP, Peter RE, Vaughan J, Rivier J et Vale W 1992. Effects of porcine follicular fluid, inhibin-A, and activin-A on goldfish gonadotropin release *in vitro*. *Endocrinology* 131, 1922–1929.
- Ge W 2000. Roles of the activin regulatory system in fish reproduction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 78, 1077–1085.
- Goetz FW et Theofan G 1979. *In vitro* stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. Effects of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone and prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology* 37, 273–285.
- Goetz FW 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. Dans *Fish Physiology Vol. 9, Part A* (eds. WS Hoar, DJ Randall et EM Donaldson), pp. 117–170. Academic Press Inc, Cambridge, Massachusetts, Etats-Unis.
- Goetz FW, Fostier AY, Breton B et Jalabert B 1987. Hormonal changes during meiotic maturation and ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 3, 203–211.
- Goetz FW et Garczynski M 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 33–38
- Gonzalez-Martinez D, Madigou T, Zmora N, Anglade I, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Antonio J, Muñoz-Cueto JA et Kah O 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-Releasing Hormone) messengers in the brain of the European sea

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Comparative Neurology* 429, 144–155.
- González-Martínez D, Zmora N, Mañanos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O et Muñoz-Cueto JA 2002. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *Journal of Comparative Neurology* 446, 95–113.
- Gopurappilly R, Ogawa S et Parhar IS 2013. Functional significance of GnRH and kisspeptin, and their cognate receptors in teleost reproduction. *Frontiers in Endocrinology* 4, 1–13.
- Goren A, Zohar Y, Fridkin M, Elhanati E et Koch Y 1990. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: L. Cleavage of native salmon GnRH and mammalian LHRH in the pituitary. *General and Comparative Endocrinology* 79, 291–305.
- Greeley MS, Hols H et Wallace RA 1991. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes *in vivo*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 100, 639–647.
- Guan GJ, Tanaka M, Todo T, Young G, Yoshikuni M et Nagahama Y 1999. Cloning and expression of two carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase cDNAs in ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255, 123–128.
- Guzman JM, Cal R, Garcia-Lopez A, Chereguini O, Kight K, Olmedo M, Sarasquete C, Mylonas CC, Peleteiro JB, Zohar Y et Mananos EL 2011. Effects of *in vivo* treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 158, 235–245.
- Haider S et Baqri SSR 2000. Cyclic AMP-mediated control of oocyte maturation in the catfish, *Clarias Batrachus* (Bloch): effects of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phosphodiesterase inhibitors. *Indian Journal of Experimental Biology* 38, 967–973.
- Hamilton TJ, Tresguerres M et Kline DI 2017. Dopamine D1 receptor activation leads to object recognition memory in a coral reef fish. *Biology letters* 13, 20170183.
- Hibbert B, Fung I, McAuley R, Larivière K, MacNeil B, Bafi-Yeboa N, Livesey J et Trudeau V 2004. Increased GAD67 mRNA levels are correlated with *in vivo* GABA synthesis in the MPTP-treated catecholamine-depleted goldfish brain. *Molecular Brain Research* 128, 121–130.
- Hibbert B, Fung I, McAuley R, Samia M et Trudeau V 2005. Catecholamine depletion modulates serum LH levels, GAD67 mRNA, and GABA synthesis in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 140, 176–183.
- Himick BA, Golosinski AA, Jonsson A-C et Peter RE 1993. CCK/gastrin-like immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 92, 88–103.
- Himick BA et Peter RE 1995. Bombesin-like immunoreactivity in the forebrain and pituitary and regulation of anterior pituitary hormone release by bombesin in goldfish. *Neuroendocrinology* 61, 365–376.
- Himick BA, Vigna SR et Peter RE 1996. Characterization of cholecystinin binding sites in goldfish brain and pituitary. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 271, 137–143.
- Hirano J, Archer SN et Djamgoz MB 1998. Dopamine receptor subtypes expressed in vertebrate (carp and eel) retinae: cloning, sequencing and comparison of five D1-like and three D2-like receptors. *Receptors and Channels* 5, 387–404.
- Isobe S 1994. The role of the dopaminergic system in the rat ovary. *Folia Endocrinologica*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Japonica 70, 457–464.
- Jackson LF et Sullivan CV 1995. Reproduction of white perch: the annual gametogenic cycle. Transactions of the American Fisheries Society 124, 563–577.
- Jalabert B et Fostier A 1984. The modulatory effect *in vitro* of oestradiol-17 β , testosterone or cortisol on the output of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropin s-GtH. Reproduction Nutrition Development 24, 127–136.
- Johansson V, Winberg S et Björnsson BT 2005. Growth hormone-induced stimulation of swimming and feeding behaviour of rainbow trout is abolished by the D1 dopamine antagonist SCH23390. General and Comparative Endocrinology 141, 58–65.
- Jokthan GE 2013. Effect of age of spawned catfish (*Clarias Gariepinus*) broodstock on quantity of eggs and milt produced and growth performance of fry. Journal of Agriculture and Veterinary Science 5, 59–61.
- Jolly C, Rousseau K, Prézeau L, Vol C, Tomkiewicz J, Dufour S et Pasqualini C 2016. Functional characterisation of eel dopamine D2 receptors and involvement in the direct inhibition of pituitary gonadotrophins. Journal of Neuroendocrinology 28, 1–15.
- Kagawa H, Young G, Adachi S et Nagahama Y 1982. Estradiol-17 β Production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. General and Comparative Endocrinology 47, 440–448.
- Kagawa H, Young G et Nagahama Y 1983. Changes in plasma steroid hormone levels during gonadal maturation in female goldfish *Carassius auratus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 49, 1783-1787.
- Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K et Kobayashi M 1998. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. General and Comparative Endocrinology 112, 80–88.
- Kagawa H, Gen K, Okuzawa K et Tanaka H 2003. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. Biology of Reproduction 68, 1562–1568.
- Kah O, Chambolle P, Thibault J et Geffard M 1984. Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. Neuroscience Letters 48, 293–298.
- Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J et Peter RE 1987. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. Neuroendocrinology 45, 451–458.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C et Lareyre JJ 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. General and Comparative Endocrinology 153, 346–364.
- Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda KI et Oka Y 2008. Identification of kiss-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology 149, 2467-2476.
- Kappus S et Fong P 2014. Sex ratio does not influence sex change despite its effect on reproductive success. Behavioral Ecology 25, 827–833.
- Kapsimali M, Dumond H, Crom S Le, Coudouel S, Vincent J et Vernier P 2000a. Evolution et développement des systèmes neuromodulateurs dopaminergiques chez les vertébrés. Journal de la Société de Biologie 194, 87–93.
- Kapsimali M, Vidal B, Gonzalez A, Dufour S et Vernier P 2000b. Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D1 receptor subtypes in the brain of the European eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D1 receptors in vertebrates.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Journal of Comparative Neurology 419, 320–343.
- Katzman PA et Doisy EA 1932. Preparation of extracts of the anterior pituitary-like substance of urine of pregnancy. *Journal of Biological Chemistry* 98, 739–754.
- Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P et Trant JM 2005. Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterone receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Molecular Endocrinology* 34, 781–791.
- Kebabian JW et Calne DB 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93–96.
- Kestemont P, Dabrowski K and Summerfelt RC 2015. *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices*. Springer, Dordrecht, Pays-Bas, pp 901.
- Khendek A, Chakraborty A, Roche J, Ledoré Y, Personne A, Policar T, Źarski D, Mandiki R, Kestemont P, Milla S et Fontaine P 2018. Rearing conditions and life history influence the progress of gametogenesis and reproduction performances in pikeperch males and females. *animal*, 1–12.
- Kim B-H, Takemura A, Kim SJ et Lee Y-D 2003. Vitellogenin synthesis via androgens in primary cultures of tilapia hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology* 132, 248–255.
- Kime DE 1993. ‘Classical’ and ‘non-classical’ reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3, 160-180.
- King W, Berlinsky DL et Sullivan CV. 1995. Involvement of gonadal steroids in final oocyte maturation of white perch (*Morone americana*) and white bass (*M. chrysops*): *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology and Biochemistry* 14, 489–500.
- King SS, Campbell AG, Dille EA, Roser JF, Murphy LL et Jones KL 2005. Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domestic Animal Endocrinology* 28, 405–415.
- King W, Thomas P, Harrell RM, Hodson RG et Sullivan CV 1994a. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *General and Comparative Endocrinology* 95, 178–191.
- King W, Thomas P et Sullivan C V. 1994b. Hormonal regulation of final maturation of striped bass oocytes *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 96, 223–233.
- Kitahashi T, Ogawa S et Parhar IS 2009. Cloning and expression of *kiss2* in the Zebrafish and Medaka. *Endocrinology* 150, 821–831.
- Klenke U, 2006. Gonadal and steroid feedback regulation of the hypothalamus-pituitary axis in striped bass (*morone saxatilis*). *The University of Maryland Libraries* pp. 253.
- Kobayashi M, Aida K et Hanyu I 1989. Induction of gonadotropin surge by steroid hormone implantation in ovariectomized and sexually regressed female goldfish. *General and comparative endocrinology* 476, 469–476.
- Koide Y, Itoh H et Kawauchi H 1993. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus plelamis*) pituitary glands. *International Journal of Peptide and Protein Research* 41, 52–65.
- Korbuly B, Grozea A, Cean A, Bănăţean-Dunea I et Păcală N 2010. Spawning latency period in hormonal induced reproduction of pikeperch (*Sander lucioperca*). *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 43, 32–35.
- Kottelat M et Freyhof J 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Waterman pp. 646.
- Kouril J, Linhart O et Relot P 1997. Induced spawning of perch by means of a GnRH analogue. *Aquaculture International* 5, 375–377.
- Kristan J, Alavi SMH, Stejskal V et Policar T 2013. Hormonal induction of ovulation in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) using human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue. *Aquaculture International* 21, 811–818.
- Kubikova L, Wada K et Jarvis ED 2010. Dopamine receptors in a songbird brain. *Journal of Comparative Neurology* 518, 741–769.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kucharczyk D, Szczerbowski A, Luczynski MJ, Kujawa R, Mamcarz A, Wyszomirska E, Szabó T et Ratajski S 2001. Artificial spawning of eurasian perch, *Perca fluviatilis* L. using Ovopel. Archives of Polish Fisheries 9, 39–49.
- Kucharczyk D, Kestemont P et Mamcarz A 2007. Artificial reproduction of pikeperch. Mercurius: Olsztyn, Poland.
- Kucharczyk D, Targońska K, Hliwa P, Gomułka P, Kwiatkowski M, Krejszeff S et Perkowski J 2008. Reproductive parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L) spawners during natural season and out-of-season spawning. Reproductive Biology 8, 285-289.
- Lam TJ 1982. Applications of endocrinology to fish culture. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39, 111–137.
- Lamers AE, Gröneveld D, De Kleijn DPV, Geeraedts FCG, Leunissen JAM, Flik G, Wendelaar Bonga SE et Martens GJM 1996. Cloning and sequence analysis of a hypothalamic cDNA encoding a D1C dopamine receptor in tilapia. Biochimica et Biophysica Acta 1308, 17–22.
- Lappalainen J, Dorner H et Wysujack K 2003. Reproduction biology of pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) - a review. Ecology of Freshwater Fish 12, 95–106.
- Lazard J et Levêque C 2009. Introductions et transferts d'espèces de poissons d'eau douce. Cahiers Agricultures 18, 157–163.
- Le Crom S 2000. Analyse comparée des récepteurs D1 de la dopamine chez les vertébrés : Définition des caractères fonctionnels spécifiques de chacun des sous-types du récepteur D1. Paris XI Orsay, pp 257.
- Le Crom S, Kapsimali M, Barôme P-O et Vernier P 2003. Dopamine receptors for every species: gene duplications and functional diversification in Craniates. Journal of Structural and Functional Genomics 3, 161–176.
- Le Menn F, Cerdà J et Babin PJ 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. Dans The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications (ed. PJ Babin), pp. 1–37. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Legendre M et Jalabert B 1983. Physiologie de la reproduction. Dans Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains (eds C Leveque, MN Bruton et GW Sentongo), pp. 153-175. Paris Orstom.
- Legendre M et Albaret JJ 1991. Maximum observed length as an indicator of growth rate in tropical fishes. Aquaculture 94, 327–361.
- Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA, Lareyre JJ et Kah O 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. General and Comparative Endocrinology 135, 1–16.
- Levavi-Sivan B, Avitan A et Kanias T 2003. Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. Fish Physiology and Biochemistry 28, 73–75.
- Levavi-Sivan B, Safarian H, Rosenfeld H, Elizur A et Avitan A 2004. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. Biology of Reproduction 70, 1545–1551.
- Levavi-Sivan B et Avitan A 2005. Sequence analysis, endocrine regulation, and signal transduction of GnRH receptors in teleost fish. General and Comparative Endocrinology 142, 67–73.
- Levavi-Sivan B, Aizen J et Avitan A 2005. Cloning, characterization and expression of the D2 dopamine receptor from the tilapia pituitary. Molecular and Cellular Endocrinology 236, 17–30.
- Levavi-Sivan B, Biran J et Fireman E 2006. Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. Biology of Reproduction 75, 642–650.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mananos EL, Gomez A et Lareyre JJ 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology* 165, 412–437.
- Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A et Udenfriend S 1965. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 148, 1–8.
- Li D, Liu Z et Xie C 2012. Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 511–520.
- Lin H-R, Zhou X-J, Van Der Kraak G et Peter RE 1991. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists and dopamine antagonists on gonadotropin secretion and ovulation in chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*. *Aquaculture* 95, 139–147.
- Linard B, Anglade I, Corio M, Navas JM, Pakdel F, Saligaut C et Kah O 1996. Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior optic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology* 63, 156–165.
- Lind EA 1977. A review of pikeperch (*Stizostedion lucioperca*), eurasian perch (*Perca fluviatilis*), and ruff (*Gymnocephalus cernua*) in Finland. *Journal de l'Office des recherches sur les pêcheries du Canada*, 1684–1695.
- Lledo P-M, Legendre P, Zhang J, Israel J-M et Vincent J-D 1990. Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotroph cells. *Neuroendocrinology* 52, 545–555.
- Lokman PM, George KAN, Divers SL, Algie M et Young G 2007. 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, *in vitro*. *Reproduction* 133, 955–967.
- Lubzens E, Young G, Bobe J et Cerdà J 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165, 367–389.
- Lukšienė D et Svedang H 1997. A review on fish reproduction with special reference to temperature anomalies. *Fiskeriverket Kustlaboratoriet*, pp. 35.
- Malison JA, Procarione LS, Barry TP, Kapuscinski AR et Kayes TB 1994. Endocrine and gonadal changes during the annual reproductive-cycle of the freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. *Fish Physiology and Biochemistry* 13, 473–484.
- Mañanós EL, Duncan N et Mylonas CC 2008. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. Dans *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. (eds. E Cabrita, V Robles et M Herraez), pp. 3–80. CRC Press, Boca Raton, Floride, Etats-Unis.
- Marsh KE, Creutz LM, Hawkins MB et Godwin J 2006. Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, *Thalassoma bifasciatum*: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. *Brain research* 6, 91–101.
- Marte CL 1989. Hormone-induced spawning of cultured tropical finfishes. Dans *Advances in tropical aquaculture: workshop à Tahiti, Polynésie française*, pp. 519–539. Plouzané, France : IFREMER.
- Martyniuk CJ, Chang JP et Trudeau VL 2007. The effects of GABA agonists on glutamic acid decarboxylase, GABA-transaminase, activin, salmon gonadotrophin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase mRNA in the goldfish (*Carassius auratus*) neuroendocrine brain. *Journal of Neuroendocrinology* 19, 390–396.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A et Schally AV 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43, 1334–1339.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mayerhofer A, Jr HCH, Snyder GL, Greengard P, Boddien S, Berg U et Brucker C 1999. Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells *in vitro*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 257–264.
- Migaud H 2002. Influence des variations de la température et de la photopériode sur le cycle de reproduction et la qualité des pontes de la perche commune *Perca fluviatilis*. *Henri Poincaré, Nancy 1*, pp. 167.
- Migaud H, Fontaine P, Sulisty I, Kestemont P et Gardeur JN 2002. Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. *Aquaculture* 205, 253–267.
- Migaud H, Mandiki R, Gardeur JN, Fostier A, Kestemont P et Fontaine P 2003a. Synthesis of sex steroids in final oocyte maturation and induced ovulation in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources* 16, 380–388.
- Migaud H, Mandiki R, Gardeur JN, Kestemont P, Bromage N et Fontaine P 2003b. Influence of photoperiod regimes on the Eurasian perch gonadogenesis and spawning. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 395-397.
- Migaud H, Davie A et Taylor JF 2010. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology* 76, 27–68.
- Milla S, Jalabert B, Rime H, Prunet P et Bobe J 2006. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and *in vitro* regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. *Journal of Experimental Biology* 209, 1147–1156.
- Milla S, Mandiki SNM, Hubermont P, Rougeot C, Mélard C et Kestemont P 2009a. Ovarian steroidogenesis inhibition by constant photothermal conditions is caused by a lack of gonadotropin stimulation in Eurasian perch. *General and Comparative Endocrinology* 163, 242–250.
- Milla S, Wang N, Mandiki SNM et Kestemont P 2009b. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology* 153, 242–251.
- Millar RP 2003. GnRH II and type II GnRH receptors. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 14, 35–43.
- Miller WL et Auchus RJ 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews* 32, 81-151.
- Miller WL 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology* 379, 62–73.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M et Caron MG 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 78, 189–225.
- Miwa S, Yan L et Swanson P 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography. *Biology of Reproduction* 50, 629-642
- Mok EYM et Munro AD 1998. Effects of dopaminergic drugs on locomotor activity in teleost fish of the genus *Oreochromis* (*Cichlidae*): Involvement of the telencephalon. *Physiology and Behavior* 64, 227–234.
- Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC et Sibley DR 1989. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342, 926–929.
- Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP et Dufour S 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61, 525–535.
- Montserrat N, González A, Méndez E, Piferrer F et Planas J V. 2004. Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β production and P-450 aromatase (CYP19) activity

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 137, 123–131.
- Mori H, Arakawa S, Ohkawa T, Ohkawa R, Takada S, Morita T et Okinaga S 1994. The involvement of dopamine in the regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Hormone Research in Paediatrics* 41, 36–40.
- Mori T, Matsumoto H et Yokota H 1998. Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 67,133-141.
- Mourot B, Nguyen T, Fostier A et Bobe J 2006. Two unrelated putative membrane-bound progesterin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and membrane progesterin receptor (mPR) β , are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 1–14.
- Müller-Belecke A et Zienert S 2008. Out-of-season spawning of pike perch (*Sander lucioperca* L.) without the need for hormonal treatments. *Aquaculture Research* 39, 1279–1285.
- Muñoz-Cueto JA, Paullada-Salmerón JA, Aliaga-Guerrero M, Cowan ME, Parhar IS et Ubuka T 2017. A journey through the gonadotropin-inhibitory hormone system of fish. *Frontiers in Endocrinology* 8, 285-303.
- Mylonas CC, Woods LC, Thomas P et Zohar Y 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *General and Comparative Endocrinology* 110, 276–289.
- Mylonas CC, Fostier A and Zanuy S 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165, 516–534.
- Nagahama Y 1983. The functional morphology of teleost gonads. Dans *Fish Physiology*, Vol. 9, Part A (eds. WS Hoar, DJ Randall et EM Donaldson), pp. 223–275. Academic Press Inc., Cambridge, Massachusetts, Etats-Unis.
- Nagahama Y 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology* 38, 217–217.
- Nagahama Y et Yamashita M 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth and Differentiation* 50, 195–219.
- Nakamura I, Evans JC, Kusakabe M, Nagahama Y et Young G 2005. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 144, 224–231.
- Nakano M, Hasunuma I, Okada R, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T et Kobayashi T 2010. Molecular cloning of bullfrog D2 dopamine receptor cDNA: tissue distribution of three isoforms of D2 dopamine receptor mRNA. *General and Comparative Endocrinology* 168, 143–148.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L et Tena-Sempere M 2005a. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146, 1689–1697.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L et Tena-Sempere M 2005b. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146, 156–163.
- Ng TB et Idler DR 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. Dans *Fish*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Physiology, Vol. 9, Part A (eds. WS Hoar, DJ Randall et EM Donaldson), pp. 373-404. Academic Press Inc., Cambridge, Massachusetts, Etats-Unis.
- Noaksson E, Gustavsson B, Linderöth M, Zebühr Y, Broman D et Balk L 2004. Gonad development and plasma steroid profiles by HRGC/HRMS during one reproductive cycle in reference and leachate-exposed female perch (*Perca fluviatilis*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 195, 247–261.
- Ogawa S et Parhar IS 2014. Structural and functional divergence of gonadotropin-inhibitory hormone from jawless fish to mammals. *Frontiers in Endocrinology* 5, 177.
- Ogiwara K, Takano N, Shinohara M, Murakami M et Takahashi T 2005. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8442–8447.
- Ohta H et Tanaka H 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. 153, 123–134.
- Okada T, Kawazoe I, Kimura S, Sasamoto Y, Aida K et Kawauchi H 1994. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *International Journal of Peptide and Protein Research* 43, 69–80.
- Omeljaniuk RJ, Shih SH et Peter RE 1987. *In vivo* evaluation of dopamine receptor-mediated inhibition of gonadotrophin secretion from the pituitary gland of the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Endocrinology* 114, 449–458.
- Osornio GA, Chavez M, Peter RE et Cardenas R 2004. Quantification of the effects of reserpine on gonadotroph expression in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Molecular Histology* 35, 417–420.
- Pace MC et Thomas P 2005. Steroid-induced oocyte maturation in atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) is dependent on activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt signal transduction pathway. *Biology of Reproduction* 73, 988–996.
- Pandey P, Mersha MD et Dhillon HS 2013. A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *Journal of Molecular Signaling* 8: 13
- Pang Y et Ge W 2002. Gonadotropin and activin enhance maturational competence of oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of reproduction* 66, 259–265.
- Pang Y, Dong J et Thomas P 2008. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology* 149, 3410–3426.
- Parhar IS, Ogawa S et Sakuma Y 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145, 3613–3618.
- Pasqualini C, Weltzien F-A, Vidal B, Baloche S, Rouget C, Gilles N, Servent D, Vernier P et Dufour S 2009. Two distinct dopamine D2 receptor genes in the European eel: molecular characterization, tissue-specific transcription, and regulation by sex steroids. *Endocrinology* 150, 1377–1392.
- Patino R, Yoshizaki G, Thomas P et Kagawa H 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: The two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B Biochemistry and Molecular Biology* 129, 427–439.
- Patino R et Sullivan CV 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Article in Fish Physiology and Biochemistry* 26, 57–70.
- Peng C, Chang JP, Yu KL, Wong AO, Van Goor F, Peter RE et Rivier JE 1993. Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. *Endocrinology* 132, 1820–1829.
- Peng C, Gallin W, Peter RE, Blomqvist AG et Larhammar D 1994. Neuropeptide-Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* 134, 1095–1113.
- Peter RE, Lin H-R et Van Der Kraak G 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74, 1–10.
- Petrino TR, Greeley Junior MS, Selman K, Lin Y-WP et Wallace RA 1989. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, testosterone and 17 β -estradiol by various components of the ovarian follicle. *General and Comparative Endocrinology* 76, 230–240.
- Peyon P, Baloche S et Burzawa-Gérard E 1997. Investigation into the possible role of androgens in the induction of hepatic vitellogenesis in the European eel: *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology and Biochemistry* 16, 107–118.
- Pinter J et Thomas P 1995. Characterization of a progestogen receptor in the ovary of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Biology of Reproduction* 52, 667–675.
- Pinter J et Thomas P 1999. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17, 20 β , 21-Trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. *General and Comparative Endocrinology* 115, 200–209.
- Planas J V., Athos J, Goetz FW et Swanson P 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biology of Reproduction* 62, 1262–1269.
- Planas J V. and Swanson P. 2008. Physiological function of gonadotropins in fish. Dans *Fish Reproduction* (eds MJ Rocha, A Arukwe, BG Kapoor), pp. 37–66. Science Publishers, Enfield, Londres, Royaume-Uni
- Podhorec P, Socha M, Sokolowska-Mikolajczyk M, Policar T, Svinger VW, Drozd B et Kouril J 2012. Dopamine control of LH release in the tench (*Tinca tinca*). *General and Comparative Endocrinology* 175, 34–38.
- Podhorec P, Socha M, Ammar I Ben, Sokolowska-Mikolajczyk M, Brzuska E, Milla S, Gosiewski G, Stejskal V, Simko M et Kouril J 2016. The effects of GnRH α with and without dopamine antagonist on reproductive hormone levels and ovum viability in tench *Tinca tinca*. *Aquaculture* 465, 158–163.
- Popesku JT, Martyniuk CJ, Denslow ND et Trudeau VL 2010. Rapid dopaminergic modulation of the fish hypothalamic transcriptome and proteome. *PLoS ONE* 5, e12338.
- Popesku JT, Navarro-Martín L et Trudeau VL 2011. Evidence for alternative splicing of a dopamine D2 receptor in a teleost. *Physiological and Biochemical Zoology* : 84, 135–46.
- Popesku JT, Martyniuk CJ et Trudeau VL 2012. Meta-type analysis of dopaminergic effects on gene expression in the neuroendocrine brain of female goldfish. *Frontiers in Endocrinology* 3, 130.
- Portavella M, Torres B et Salas C 2004. Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of Neuroscience* 24, 2335–2342.
- Poulet N 2004. Le sandre (*Sander lucioperca* (L)) : biologie, comportement et dynamique des populations en Camargue (Bouches du Rhône, France). Université Toulouse III, pp. 300.
- Powell JF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA et Sherwood NM 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 12081–12085.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Power DM, Canario AVM et Ingleton PM 1996. Somatotropin release-inhibiting factor and galanin innervation in the hypothalamus and pituitary of seabream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* 101, 264–274.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, De Mones A et Foptier A 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology* 78, 361–373.
- Prat F, Sumpter JP et Tyler CR 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 54, 1375-1382.
- Qi X, Zhou W; Li S, Lu D, Yi S, Xie R, Liu X, Zhang Y et Lin H 2013. Evidences for the regulation of GnRH and GTH expression by GnIH in the goldfish, *Carassius auratus*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 366, 9-20.
- Ramezani-Fard E, Kamarudin MS et Harmin SA 2013. Endocrine control of oogenesis in teleosts. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 205–215.
- Rangaraju NS, Xu J and Harris RB 1991. Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinology* 53, 20–28.
- Reddymasu SC, Soykan I et McCallum RW 2007. Domperidone: review of pharmacology and clinical applications in gastroenterology. *American Journal of Gastroenterology* 102, 2036–2045.
- Rinchart J, Kestemont P, Kühn ER et Fostier A 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L. (*Teleostei, Cyprinidae*). *General and Comparative Endocrinology* 92, 168–178.
- Rinchart J, Poncin P et Kestemont P 1998. Croissance ovocytaire et régulation stéroïdienne chez les poissons à pontes uniques et multiples : une revue. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 34, 211–225.
- Rohr DH, Lokman PM, Davie PS et Young G 2001. 11-Ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla australis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 130, 701-714.
- Ronyai A 2007. Induced out-of-season and seasonal tank spawning and stripping of pikeperch (*Sander lucioperca* L.). *Aquaculture Research* 38, 1144–1151.
- Ronyai A et Lengyel SA 2010. Effects of hormonal treatments on induced tank spawning of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Aquaculture Research* 41, 345–348.
- Rubí B et Maechler P 2010. Minireview: New roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance. *Endocrinology* 151, 5570–5581.
- Saramah SP, Falahatkar B, Takami GA et Efatpanah I 2012. Effects of different photoperiods and handling stress on spawning and reproductive performance of pikeperch *Sander lucioperca*. *Animal Reproduction Science* 132, 213–222.
- Schaefer FJ et Wuertz S 2016. Insights into kisspeptin- and leptin-signalling on GnRH mRNA expression in hypothalamic organ cultures of immature pikeperch *Sander lucioperca*. *International Aquatic Research* 8, 191–196.
- Schlumberger O et Proteau JP 1996. Reproduction of pike-perch (*Stizostedion lucioperca*) in captivity. *Journal of Applied Ichthyology* 12, 149–152.
- Schmitz M, Aroua S, Elie P, Dufour S, Vidal B et Le Belle N 2005. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81, 107–119.
- Scott AP, Sumpter JP et Hardman PA 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *General and Comparative Endocrinology* 49:128-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 134.
- Sébert ME, Legros C, Weltzien FA, Malpaux B, Chemineau P et Dufour S 2008a. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 917–929.
- Sébert ME, Weltzien FA, Moisan C, Pasqualini C et Dufour S 2008b. Dopaminergic systems in the European eel: characterization, brain distribution, and potential role in migration and reproduction. *Hydrobiologia* 602, 27–46.
- Selman K, Wallace RA, Sarka A et Qi X 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology* 218, 203–224.
- Senthilkumaran B, Sudhakumari CC, Chang XT, Kobayashi T, Oba Y, Guan G, Yoshiura Y, Yoshikuni M et Nagahama Y 2002. Ovarian carbonyl reductase-like 20 β -Hydroxysteroid deshydrogenase shows distinct surge in messenger RNA expression during natural and gonadotropin-induced meiotic maturation in Nile tilapia. *Biology of Reproduction* 67, 1080–1086.
- Sharaf SM 2012. Effect of GnRH α , pimoziide and Ovaprim on ovulation and plasma sex steroid hormones in African catfish *Clarias gariepinus*. *Theriogenology* 77, 1709–1716.
- Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J et Vale W 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 2794–2798.
- Shourbela RM, Abd El-latif AM et Abd-El-Azem MA 2014. Induced spawning of african catfish, *clarias gariepinus* using (GnRH α) combined with dopamine antagonists. *Benha Veterinary Medical Journal* 27, 25–35.
- Singh V, Chaube R, Chourasia TK et Joy KP 2010. Temporal and periovulatory changes in ovarian catecholamines in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *General and Comparative Endocrinology* 168, 46–54.
- Smeets WJ et Gonzalez A 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain research reviews* 33, 308–379.
- Stacey N, Chojnacki A, Narayanan A, Cole T et Murphy C 2003. Hormonally derived sex pheromones in fish: exogenous cues and signals from gonad to brain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81, 329–341.
- Steffens W, Geldhauser F, Gerstner P et Hilge V 1996. German experiences in the propagation and rearing of fingerling pikeperch (*Stizostedion lucioperca*). *Annales Zoologici Fennici* 33, 627–634.
- Stepien CA et Haponski AE 2015. Taxonomy, distribution, and evolution of the percidae. Dans *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices* (eds. P Kestemont, K Dabrowski, RC Summerfelt), pp. 3–60. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Steven C, Lehnen N, Kight K, Ijiri S, Klenke U, Harris WA et Zohar Y 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *General and Comparative Endocrinology* 133, 27–37.
- Sugamori KS, Demchyshyn LL, Chung M et Niznik HB 1994. D1A, D1B, and D1C dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 10536–10540.
- Sulistyo I, Rinchar J, Fontaine P, Gardeur J, Capdeville B et Kestemont P 1998. Reproductive cycle and plasma levels of sex steroids in female Eurasian perch. *Aquatic Living Resources* 11, 101–110.
- Suzuki K, Kanamori A, Nagahama Y, et Kawauchi H 1988a. Development of salmon GTH I and GTH II radioimmunoassays. *General and Comparative Endocrinology* 71, 459–467.
- Suzuki K, Kawauchi H et Nagahama Y 1988b. Isolation and characterization of subunits from

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- two distinct salmon gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology* 71, 302–306.
- Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H et Dickhoff WW 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biological of Reproduction* 44, 29–38.
- Swanson P, Dickey JT et Campbell B 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 53–59.
- Szabó T 2003. Ovulation induction in northern pike *Esox lucius* L. using different GnRH analogues, Ovaprim, Dagin and carp pituitary. *Aquaculture Research* 34, 479–486.
- Tan Q, Zagrodny A, Bernaudo S et Peng C 2009. Regulation of membrane progesterin receptors in the zebrafish ovary by gonadotropin, activin, TGF- β and BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312, 72–79.
- Tanaka M, Nakajin S, Kobayashi D, Fukada S, Guan G, Todo T, Senthilkumaran B et Nagahama Y 2002. Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biology of reproduction* 66, 1498–1504.
- Thomas P, Pinter J et Das S 2001. Upregulation of the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries by gonadotropin during oocyte maturation and its physiological significance. *Biology of Reproduction* 64, 21–29.
- Thomas P, Pang Y, Zhu Y, Detweiler C et Doughty K 2004. Multiple rapid progesterin actions and progesterin membrane receptor subtypes in fish. *Steroids* 69, 567–573.
- Thomas P, Dressing G, Pang Y, Berg H, Tubbs C, Benninghoff A et Doughty K 2006. Progesterin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids* 71, 310–316.
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P et Tokumoto T 2006. Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology* 145, 101–108.
- Treves-Brown KM 2000. 17. Breeding induction agents. Dans *Applied Fish Pharmacology* (ed MG Poxton), pp. 309. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Trudeau V 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of Reproduction* 2, 55–68.
- Trudeau V, Crump D, Canada E et Schulz R 2000. The role of amino acids in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish hormonal regulation of zebrafish spermatogenesis. *Biochemistry and Cell Biology* 78, 241–259.
- Vacher C, Mananos EL, Breton B, Marmignon MH et Saligaut C 2000. Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *Journal of Neuroendocrinology* 12, 1219–1226.
- Vacher C, Ferrière F, Marmignon MH, Pellegrini E et Saligaut C 2002. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 127, 198–206.
- Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferrière F, Saligaut C et Kah O 2003. Distribution of dopamine D2 receptor mRNAs in the brain and the pituitary of female rainbow trout: an *in situ* hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 458, 32–45.
- Van Aerle R, Kille P, Lange A et Tyler CR 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29, 57–64.
- Van Der Kraak G, Suzuki K, Peter RE, Itoh H et Kawauchi H 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *General and Comparative Endocrinology* 85, 217–229.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Van Der Kraak G, Chang JP et Janz DM 1997. Reproduction. Dans *The Physiology of Fishes* Second Edition (ed Evans DH), pp 465-488. CRC Press, Boca Raton, New York, Etats-Unis.
- Van Goor F, Goldberg JI et Chang JP 1996. Involvement of Extracellular Sodium in Agonist-Induced Gonadotropin Release from Goldfish (*Carassius auratus*) Gonadotrophs. *Endocrinology*, 2859–2871.
- Van Goor F, Goldberg JI et Chang JP 1998. Dopamine-D2 actions on voltage-dependent calcium current and gonadotropin-II secretion in cultured goldfish gonadotrophs. *Journal of Neuroendocrinology* 10, 175–186.
- Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland MCH, Sbaihi M, Vernier P, Zohar Y et Dufour S 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile european eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biology of Reproduction* 71, 1491–1500.
- Wallace RA et Selman K 1978. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. L. preliminary observations on oocyte maturation *in vivo* and *in vitro*. *Developmental Biology* 62, 354–369.
- Wallace RA et Selman K 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, 21, 325-343.
- Wallace RA et Selman K 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy Technique* 16, 175–201.
- Wang Y et Ge W 2002. Cloning of zebrafish ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of its spatial and temporal expression. *General and Comparative Endocrinology* 127, 209–216.
- Wang N, Teletchea F, Kestemont P, Milla S et Fontaine P 2010. Photothermal control of the reproductive cycle in temperate fishes. *Reviews in Aquaculture* 2, 209–222.
- Wang Q, Qi X, Guo Y, Li S, Zhang Y, Liu X et Lin H 2015. Molecular identification of GnIH/GnIHR signal and its reproductive function in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology* 216, 9-23.
- Weil C, Bougoussa-Houadec M, Gallais C, Itoh S, Sekine S et Valotaire Y 1995. Preliminary evidence suggesting variations of GtH1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 100, 327–333.
- Weltzien FA, Norberg B et Swanson P 2003. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *General and Comparative Endocrinology* 131, 97–105.
- Xing L, Esau C et Trudeau VL 2016. Direct regulation of aromatase B expression by 17 β -estradiol and dopamine D1 receptor agonist in adult radial glial cells. *Frontiers in Neuroscience* 9, 1–11.
- Yamamoto K et Vernier P 2011. The evolution of dopamine systems in chordates. *Frontiers in Neuroanatomy* 5, 21.
- Yamamoto K, Mirabeau O, Bureau C, Blin M, Michon-Coudouel S, Demarque M et Vernier P 2013. Evolution of dopamine receptor genes of the D1 class in vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 30, 833–843.
- Yamamoto K, Fontaine R, Pasqualini C et Vernier P 2015. Classification of dopamine receptor genes in vertebrates: nine subtypes in Osteichthyes. *Brain Behavior and Evolution* 86, 164–175.
- Yan L, Swanson P et Dickhoff WW 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biology of Reproduction* 47, 418–427.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Yaron Z 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129, 49–73.
- Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A et Levavi-Sivan B 2003. Regulation of fish gonadotropins. *International Review of Cytology* 225, 131–185.
- Yaron Z et Levavi-Sivan B 2011. Endocrine regulation of fish reproduction. Dans *Encyclopedia of Fish Physiology: from Genome to Environment* (ed. AP Farrell), pp. 1500–1508. Academic Press, San Diego, Californie, Etats-Unis.
- Yu KL, Sherwood NM et Peter RE 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 9, 625–630.
- Yu KL, Rosenblum PM et Peter RE 1991. *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 81, 256–267.
- Yu KL et Peter RE 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 85, 138–146.
- Zakes Z et Szczepkowski M 2004. Induction of out-of-season spawning of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture International* 12, 11–18.
- Zakes Z et Demska-Zakes K 2005. Artificial spawning of pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)) stimulated with human chorionic gonadotropin (hCG) and mammalian GnRH analogue with a dopamine inhibitor. *Archives of Polish Fisheries* 13, 63–75.
- Zakes Z et Demska-Zakes K 2009. Controlled reproduction of pikeperch *Sander lucioperca* (L.): a review. *Archives of Polish Fisheries* 17, 153–170.
- Żarski D, Kucharczyk D, Targońska K, Jamróz M, Krejszef S et Mamcarz A 2009. Application of ovopel and ovaprim and their combinations in controlled reproduction of two reophilic cyprinid fish species. *Polish Journal of Natural Science* 24, 235–244.
- Żarski D, Kucharczyk D, Targonska K, Palińska K, Kupren K, Fontaine P et Kestemont P 2012a. A new classification of pre-ovulatory oocyte maturation stages in pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), and its application during artificial reproduction. *Aquaculture Research* 43, 713–721.
- Żarski D, Krejszef S, Palińska K, Targońska K, Kupren K, Fontaine P, Kestemont P et Kucharczyk D 2012b. Cortical reaction as an egg quality indicator in artificial reproduction of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 843-850.
- Żarski D, Targonska K, Kaszubowski R, Kestemont P, Fontaine P, Krejszef S, Kupren K et Kucharczyk D 2013. Effect of different commercial spawning agents and thermal regime on the effectiveness of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), reproduction under controlled conditions. *Aquaculture International* 21, 819–828.
- Żarski D, Krejszef S, Palińska-Żarska K et Kucharczyk D 2015a. Controlled reproduction of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.)-achievements and prospects. Dans VI International Conference ‘Water & Fish’, pp. 82–87.
- Żarski D, Horvath A, Held JA et Kucharczyk D 2015b. Artificial reproduction of percid fishes. Dans *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices* (eds. P Kestemont, K Dabrowski et RC Summerfelt), pp. 123–161. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Zhang Y, Li S, Liu Y, Lu D, Chen H, Huang X, Liu X, Meng Z, Lin H et Cheng CHK 2010. Structural diversity of the gnih/gnih receptor system in teleost: its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptides* 31, 1034-1043.
- Zhou L-Y, Wang D-S, Kobayashi T, Yano A, Paul-Prasanth B, Suzuki A, Sakai F et Nagahama Y 2007a. A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- biosynthesis in the fish ovary and head kidney. *Endocrinology* 148, 4282–4291.
- Zhou L-Y, Wang D-S, Shibata Y, Paul-Prasanth B, Suzuki A et Nagahama Y 2007b. Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 619–625.
- Zhu Y, Bond J et Thomas P 2003a. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2237–2242.
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M and Thomas P 2003b. Cloning, expression, et characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 2231–2236.
- Zmora N, Stubblefield JD, Wong T-T, Levavi-Sivan B, Millar RP et Zohar Y 2015. Kisspeptin antagonists reveal kisspeptin 1 and kisspeptin 2 differential regulation of reproduction in the teleost, *Morone saxatilis*. *Biology of Reproduction* 93, 1–12.
- Zohar Y, Goren A, Tosky M, Pagelson G, Leibovitz D et Koch Y 1989. The bioactivity of gonadotropin releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 59–67.
- Zohar Y, Goren A, Fridkin M, Elhanati E et Koch Y 1990. Degradation of Gonadotropin-Releasing Hormones in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* II. cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney, and liver. *General and Comparative Endocrinology* 79, 306–319.
- Zohar Y et Mylonas CC 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136.
- Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A et Kah O 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 438–455.

VALORISATIONS
SCIENTIFIQUES

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

2018 : Khendek A., Chakraborty A., **Roche J.**, Ledoré Y., Personne A., Policar T. Zarski D., Mandiki R., Kestemont P., Milla S. and Fontaine P. Rearing conditions and life history influence the progress of gametogenesis and reproduction performances in males and females. *animal*. 1-12

Roche J., Zarski D., Khendek A., Ben ammar I., Broquard C., Depp A., Ledoré Y., Policar T., Fontaine P. and Milla S. D1 dopamine receptor, but not D2, regulates steroid levels during final stages of pikeperch gametogenesis. *animal*, 1-11

2017 : **Roche J.**, Rame C., Reverchon M., Namya M., Rak A., Froment P., Dupont J. Apelin (APLN) regulates progesterone secretion and oocyte maturation in bovine ovarian cells. *Reproduction*. 153

2016 : **Roche J.**, Rame C., Reverchon M., Namya M., Cornuau M., Guerif F., Froment P., Dupont J. Apelin (APLN) and apelin receptor (APLNR) in human ovary : expression, signaling, and regulation of steroidogenesis in primary human luteinized granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 95, 1-12.

Communications orales

2018 : **Roche J.**, Hergalant S., Zarski D., Policar T., Fontaine P. and Milla S. Characterization, distribution and role of dopamine receptors in pikeperch during the pre-ovulatory period. *International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (ISRPF 2018)*. Manaus, Brazil. June 3-8, 2018.

2017 : **Roche J.**, Zarski D., Khendek A., Broquard C., Ledoré Y., Policar T., Fontaine P. and Milla S. Evaluation of D1 & D2 dopamine receptors involvement in the reproductive cycle of pikeperch. *Society for Experimental Biology (SEB)*. Gothenburg, Sweden. July 3-6, 2017.

2016 : **Roche J.**, Zarski D., Khendek A., Policar T., Ledoré Y., Milla S., Fontaine P. Inefficacité des antagonistes des récepteurs de la dopamine, SCH23390 et métoclopramide pour induire l'ovulation du sandre, *Sander lucioperca*. *Journées de la Recherche Filière Piscicole*. Paris, France. 5-6 Juillet 2016.

RESUME/ABSTRACT

Implication des récepteurs de la dopamine dans la régulation de l'axe gonadotrope en période pré-ovulatoire chez le sandre, *Sander lucioperca*

Dans le cadre de la production de nouvelles espèces aquacoles, le sandre, *Sander lucioperca*, est devenu, depuis plusieurs années, une espèce d'intérêt piscicole en raison de sa valeur économique potentielle. Pour développer et pérenniser sa production aquacole, il est nécessaire de comprendre et maîtriser son cycle de reproduction ainsi que les mécanismes physiologiques mis en jeu afin d'obtenir des œufs et des juvéniles viables tout au long de l'année. Dans cet optique d'optimisation du contrôle du cycle, la dopamine apparaît, chez de nombreux téléostéens dont certains perciformes, comme un inhibiteur de l'axe gonadotrope, via les récepteurs de la famille D₂, en bloquant le pulse ovulatoire de LH et l'ovulation. Chez le sandre, le rôle de la dopamine et de ses récepteurs, notamment les récepteurs de la famille D₁, est inconnu. L'objet de cette thèse est de déterminer le rôle du système dopaminergique lors des phases finales de l'ovogénèse chez le sandre à travers trois axes principaux : (1) déterminer l'effet du blocage des récepteurs de la dopamine, D₁ ou D₂, sur la régulation de l'axe gonadotrope et l'induction de l'ovulation en absence et en présence d'une molécule de sGnRHa, (2) définir le répertoire et le profil d'expression des récepteurs dopaminergiques par l'étude du transcriptome cérébral du sandre en période pré-ovulatoire et (3) établir le rôle de la dopamine et de ses différents récepteurs (familles D₁ et D₂) dans la régulation directe et locale de l'axe gonadotrope aux niveaux cérébral et ovarien.

La première partie de ce travail a permis pour la première fois, par l'utilisation d'antagonistes spécifiques des familles de récepteurs D₁ et D₂, de mettre en évidence un rôle potentiel de la dopamine sur la sécrétion de certains stéroïdes sexuels en période pré-ovulatoire chez le sandre par l'intermédiaire des récepteurs de la famille D₁. L'identification de l'ensemble des récepteurs de la dopamine existant chez le sandre nous a permis de confirmer leur expression à tous les niveaux de l'axe gonadotrope (cerveau, hypophyse et ovaires) étayant l'hypothèse d'un rôle de la dopamine dans la reproduction du sandre. Enfin, la dernière partie de ce projet a permis de montrer un rôle régulateur du système dopaminergique, directement au niveau ovarien, sur la production de testostérone par l'intermédiaire des deux familles de récepteurs de la dopamine. L'implication des deux familles de récepteurs a également été mise en évidence dans la production ovarienne de la 17 β -estradiol. Au niveau cérébral, seule la famille des récepteurs D₂ a été montrée impliquée dans la régulation de l'expression du gène de la GnRH-3. De façon générale, cette étude a permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs de la dopamine dans la régulation de l'axe gonadotrope lors des phases finales de l'ovogénèse. Toutefois, des travaux ultérieurs devront être menés pour approfondir les mécanismes physiologiques mis en jeu. D'un point de vue aquacole, les traitements hormonaux à base d'antagonistes des récepteurs de la dopamine ont été inefficaces pour améliorer les performances de reproduction du sandre ce qui n'est pas en faveur de leur utilisation future pour induire l'ovulation chez cette espèce. Ainsi, la mise au point d'autres méthodes d'optimisation sera nécessaire pour continuer à développer la production aquacole du sandre.

Mots clefs : Dopamine, récepteurs dopaminergiques, sandre, ovulation, stéroïdes sexuels

Dopamine receptors involvement in the regulation of the gonadotropic axis during the pre-ovulatory period in pikeperch, *Sander lucioperca*

Pikeperch, *Sander lucioperca*, is a potential valuable economic fish, making it a species of interest for aquaculture diversification. In the domestication process, controlling and understanding the reproductive cycle is a crucial step in order to produce viable offspring in a synchronous and predictable way. In many teleosts including some perciforms, dopamine inhibits the ovulatory pulse of LH and the ovulation step through D₂ dopamine receptors family. In pikeperch, the roles of dopamine and its receptors, especially those belonging to the D₁ receptors family, are unknown. For the purpose of the optimization of pikeperch reproduction, we investigated the role of the dopaminergic system during the final stages of oogenesis in this species: (1) by determining the effects of D₁ or D₂ receptor antagonists alone or in association with sGnRHa on the regulation of the reproductive axis and on the induction of ovulation, (2) by determining the repertoire and the expression profile of the dopamine receptors using a brain transcriptome analysis during the pre-ovulatory period and (3) by evaluating the role of dopamine and its receptors (D₁ and D₂ families) in the direct and local regulation of the gonadotropic axis at the brain and ovarian levels.

For the first time, we showed that the dopamine/D₁ receptors complex regulates the sex-steroids release during the pre-ovulatory period, suggesting that dopamine is involved in pikeperch reproduction. Also, we support its involvement thanks to the identification of the dopamine receptors gene expression at the brain, pituitary and ovarian levels. Finally, we showed that the dopaminergic system directly regulates the ovarian testosterone production, through both D₁ and D₂ receptor families. The involvement of both dopamine receptor families was also highlighted on ovarian 17 β -estradiol production. Only the D₂ receptor family was shown to be involved on the brain GnRH-3 gene expression. In conclusion, we point out a dopamine receptors implication on the gonadotropic axis regulation during the final stages of oogenesis in pikeperch. However, further studies should be performed to pinpoint the physiological mechanisms behind this phenomenon. From an aquaculture point of view, hormonal treatments with dopamine receptor antagonists appear to be ineffective to improve pikeperch reproductive performances. Therefore, their use to induce pikeperch ovulation should be put into question and the development of alternative methods is necessary to further promote pikeperch production.

Keywords: Dopamine, dopamine receptors, pikeperch, ovulation, sex-steroids