HAL open science

Dosage radioimmunologique des gonadotropines de poissons

Bernard Breton, Elisabeth Sambroni, Yonathan Zohar

To cite this version:

Bernard Breton, Elisabeth Sambroni, Yonathan Zohar. Dosage radioimmunologique des gonadotropines de poissons. Bases biologiques de l'aquaculture, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER). FRA., Dec 1983, Montpellier, France. hal-01601065

HAL Id: hal-01601065

https://hal.science/hal-01601065v1

Submitted on 4 Jun 2020

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

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

Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Bases biologiques de l'aquaculture. Montpellier. 1983
IFREMER. Actes de Colloques n. 1, pages 295 à 308

DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DES GONADOTROPINES DE POISSONS

B. BRETON, E. SAMBRONI, Y. ZOHAR
Lab. Physiologie des poissons-INRA-Av. Gal Leclerc-35042 RENNES Cédex

R E S U M E

La spécificité immunologique des gonadotropines de Poissons n'autorise généralement pas l'utilisation des systèmes de dosage radioimmunologique (RIA) homologues existant pour les GtH Carpe et Saumon, à la mesure concentrations de GtH hypophysaire et plasmatique d'autres espèces. L'emploi d'un système de dosage utilisant un anticorps dirigé contre la sous-unité β de GtH de Carpe a cependant récemment permis le développement d'une méthode de dosage de la GtH d'Anguille (Dufour et al., 1983). Nous avons repris un travail similaire à partir de la sous-unité β de la GtH glycoprotéique maturante de Saumon, mais également étudié la possibilité d'employer des systèmes sous-unitaires mixtes Carpe - Saumon au dosage de la GtH dans des espèces où elle n'est pas encore purifiée. Dans ce but des sous-unités α et β ont été purifiées à partir de GtH de Carpe et Saumon, et été utilisées pour la préparation des anticorps correspondants. L'analyse en liaison directe en compétition des comportements des différents antigènes iodés et des 6 anticorps confirme la spécificité zoologique importante des sous-unités de type α. Par contre les systèmes mettant en jeu un composant de type β homologue ou hétérologue reconnaissant aussi bien les gonadotropines de Carpe et de Saumon et leurs sous-unités β. Les différentes liaisons anti (s.GtH - β s.GtH - c.GtH - β c.GtH) hormones iodées (s.GtH - β s.GtH - c.GtH - β c.GtH) ont été étudiées par rapport à leur déplacement par des extraits hypophysaires totaux ou des GtH partiellement purifiées de Brochets - Perche - Daurade - Tilapia - Anguille - Milkfish. Il a toujours été possible de trouver une ou plusieurs combinaisons antigène anticorps paraissant spécifiquement déplacées par chacune de ces préparations hypophysaires. La validation du dosage a été réalisée pour la GtH de Daurade pour laquelle il existe une bonne correspondance entre les activités des fractions obtenues après gel filtration des glycoprotéines hypophysaires totales, mesurées par RIA, et par un dosage biologique basé sur la stimulation de la production in vitro de 17α-hydroxy-20β-dihydroprogestérone par des follicules ovariens de Truite arc-en-ciel en présence d'un inhibiteur de la phosphodiestérase l'IBMX. Pour la Perche, bien que la réaction croisée ne soit que partielle, une mesure relative des niveaux de GtH apparaît possible. Une stimulation in vivo des niveaux plasmatiques hormonaux théoriques par du LH-RH et du LH-RHa confirme la nature gonadotrope du principe mesuré dans un système anti β s.GtH - c.GtH I^{125}.

A B S T R A C T

The species specificity of fish gonadotropins generally does not allow the use of Carp and Salmonid homologous RIA systems for GtH measurement in other species. Recently, Dufour et al., (1983) have demonstrated the lack of specificity of a system directed against the β subunit of the Carp GtH, we have developped a similar system for the β subunit of the Salmon GtH, and equally studied the possibility offered by heterologous subunits system between Carp and Salmon to measure the GtH in several other species. Antibody against α and β s.GtH from those two species have been developped. The species specificity of the two α subunits has been confirmed after studying the direct bindings and competitions between the 6 iodinated antigens and the corresponding antibodies, but on the contrary the systems in which a homologous or heterologous β component is included recognized as well c and s.GtH and their β subunits. Using the different combinations between anti s.GtH - β s.GtH - c.GtH - β c.GtH and the codinated s.GtH - β s.GtH - c.GtH - β c.GtH, it has always been possible to find one or several which is specifically competed by partially purified pike and sparus GtH and pituitary extracts from perch - tilapia - eel milkfish. The validation of the assay has been done for sparus GtH after comparison with a bioassay developped for this gonadotropin.

MOTS CLES:Gonadotropine - Immunoessais KEY WORDS:Gonadotropin - immunoassays

INTRODUCTION

L'étude écophysiologique des mécanismes de régulation de la fonction de reproduction des Poissons nécessite, entre autres outils méthodologiques, de disposer d'hormones gonadotropes purifiées (GtH) et de leur dosage radioimmunologique. Bien que ces outils aient été développés pour deux grandes familles, les Cyprinidés (Breton et al., 1971), et les Salmonidés (Crim et al., 1973; Breton et al., 1975), ils ne peuvent généralement pas être utilisés pour d'autres espèces à cause d'une spécificité zoologique qui intéresse aussi bien les propriétés immunologiques des GtH (Breton et al., 1972; Tan et Dodd 1978; Bye et al., 1980) que leurs activités biologiques (Breton et al., 1972; Fontaine et al., 1972). Dans les espèces marines éventuellement candidates à l'aquaculture intensive (Bar, Daurade, poissons plats...) seule la GtH d'un poisson plat, la plie américaine, a été isolée (Ng et Idler, 1978). Or la reproduction régulière de ces espèces élevées en captivité pose encore de nombreux problèmes (contrôle de la saison de ponte, déclenchement des mécanismes de maturation et d'ovulation au moment opportun, mécanisme de reversion sexuelle chez la Daurade par exemple...). L'étude de la dissociation des GtH de Carpe (Burzawa-Gérard, 1974) et de Saumon (Breton, 1981) a permis de montrer que, contrairement aux gonadotropines natives, leurs sous-unités de type β présentaient une spécificité immunologique relativement faible (Burzawa-Gérard et Kerdelhué, 1978 ; Dufour et al., 1979; Burzawa-Gérard et al., 1980). A partir de ces données, ces auteurs ont développé un dosage radioimmunologique hétérologue de la GtH de l'Anguille européenne Anguilla anguilla en utilisant un dosage radioimmunologique de la sous-unité β de la GtH de Carpe (Dufour et al., 1983). Dans le travail présent nous avons étudié les possibilités offertes par l'utilisation d'un système équivalent, préparé à partir de la GtH de Saumon, mais par des systèmes mixtes Carpe - Saumon pour la détection de la GtH dans des préparations hypophysaires d'origine zoologique très diverses dont la Daurade, pour laquelle les premiers stades de purification de la GtH ont également été définis, l'obtention de l'hormone purifiée étant un préalable à toute étude de l'action biologique spécifique d'une gonadotropine dans une espèce donnée.

MATERIEL ET METHODES

1. - Préparation des GtH de Carpe et de Saumon et de leurs sous-unités

Ces hormones ont été préparées par les techniques décrites précédemment pour la s-GtH (Breton et al., 1978) et ses unités (Breton, 1981). Elles ont servi à la préparation d'anticorps sur lapin. L'immunisation a été pratiquée par injection intradermique multipoints de 100 µg de chaque préparation émulsionnée dans de l'adjuvent de Freund complet. Chaque lapin a reçu 5 injections espacées de 15 jours. Le sacrifice de l'animal a lieu 8 jours après la dernière injection. Deux anticorps ont été préparés contre la s-GtH - 2 contre l'α-s-GtH - 4 contre la β-s-GtH - 2 contre la c-GtH - 2 contre l'α-c-GtH et 3 contre la β-c-GtH.

2. - Techniques radioimmunologiques

La technique utilisée est identique à celle décrite précédemment pour la GtH de Carpe (Breton et al., 1971). Les marquages des 2 GtH et de leurs sous-unités sont réalisés à l'I^{125} après oxydation par la Chloramine T, la purification des traceurs marqués est faite sur colonne d'ultrogel ACA 54 (0,9 x 30 cm). Les divers anticorps ont été titrés par étude de leur liaison aux antigènes radioiodés correspondant. Seul l'anticorps présentant le plus haut titre de travail a été retenu pour la poursuite du travail (50% de la liaison maximum).

anti	s-GtH	1/2	10^{-5}
anti	βs-GtH		10^{-5}
anti	αs-GtH		10^{-5}
anti	c-GtH	1/3	10^{-5}

anti	8c-GtH		10^{-5}
anti	αc-GtH	1/4	10^{-4}

Etude en liaison directe : La liaison de chacun des 6 antigènes radioiodés aux 6 types d'anticorps a été étudiée après une incubation de 24 heures à 4°C en tampon véronal 0.025 M pH 8.6 contenant 10‰ de BSA. Le complexe antigène - anticorps est séparé par immunoprécipitation à l'aide d'un sérum de mouton anti γ globulines de lapin préparé au laboratoire. Après incubation d'une nuit à 4°C, le précipité formé est séparé par centrifugation (1500 g) pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé par retournement des tubes et les précipités comptés dans un compteur autogamma 5110 PACKARD.

Etude en compétition : Le déplacement de la liaison à l'équilibre de chaque anticorps aux 6 antigènes radioiodés a été étudié pour les 6 anticorps différents par les 6 antigènes eux-mêmes et par des extraits hypophysaires d'Anguille européenne Anguilla anguilla, de Tilapia Sarothérodon mossambica, de Daurade Sparus auratus, de Milkfish Chanos chanos, et de Brochet Esox lucius, espèces présentant toutes un intérêt aquacole important. La compétition par des GtH partiellement purifiées de Brochet et Daurade a aussi été étudiée. Après incubation de 4 jours à 4°C le complexe hormone anticorps est séparé par la même technique que précédemment. Pour chaque facteur les caractéristiques de la courbe de compétition sont déterminées après transformation logit - log des résultats. Dans chaque système anticorps-antigène iodé, les pentes des courbes d'inhibition produites par chaque préparation hypophysaire ont été comparées à celle obtenue en présence de l'antigène froid correspondant par analyse de covariance selon Snedecor et Cochran (1957).

3. - Préparations hypophysaires

Les extraits hypophysaires bruts ont été préparés par broyage des hypophyses désséchées à l'acétone dans un homogénéiseur verre teflon. Les broyats ont été centrifugés 20 minutes à 2500 g, à 4°C. La concentration protéique des surnageants est déterminée par colorimétrie à l'aide du réactif de folin ciocalteu (Lowry et al., 1951). Les contenus en GtH des hypophyses sont exprimés en ng/mg de protéines hypophysaires. Pour le Brochet et la Daurade nous avons utilisé des GtH partiellement purifiées. La GtH de Brochet (b-GtH) a été purifiée en suivant la méthodologie développée pour la s-GtH (Breton et al., 1978) à partir de 200 hypophyses collectées sur des femelles sacrifiées après un traitement gonadotrope d'induction de ponte en Février Mars 1980. Les glycoprotéines hypophysaires séparées sur colonne de concanavaline A sépharose subissent une chromatographie d'exclusion sur colonne d'ultrogel ACA 54 (100 x 1,5 cm). Après concentration les fractions actives sur le test de maturation intrafolliculaire des ovocytes de Truite arc-en-ciel (Jalabert et al., 1974) ont été déposées sur une colonne de DEAE cellulose biogel A 0,5 x 5 cm équilibrée en tampon tris 0.01M pH 7.8. Les produits non retenus sont recueillis en une seule fraction. Les protéines retenues sont éluées par une solution de NaCl 0,15M sans être fractionnées. La fraction non retenue n'a pas d'activité biologique, alors que les protéines éluées par le NaCl possèdent 38% de l'activité d'un standard de s-GtH purifiée, sur le test de maturation intrafolliculaire des ovocytes de Truite arc-en-ciel. Cette fraction n'est pas homogène et présente 4 bandes en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5%.

La même procédure a été appliquée à un mélange d'hypophyses liophylisées de Daurade (0.376 g) prélevées à la Station de Mariculture d'Elat (Israël) pendant la période de reproduction 1980 et de 3.412 g d'hypophyses congelées fraiches, prélevées pendant la même période en 1981. Seules les 2 premiers stades de purification qui ont donné 3,15 mg de protéines biologiquement actives ont été réalisés. La concordance entre un dosage biologique et un dosage radioimmunologique a été recherchée.

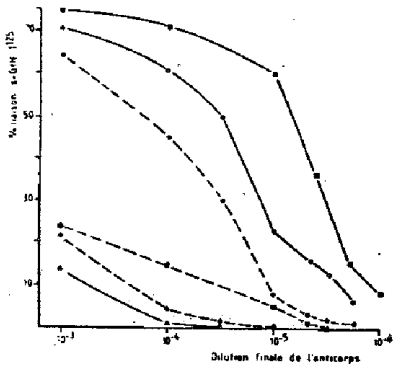

FIGURE 1

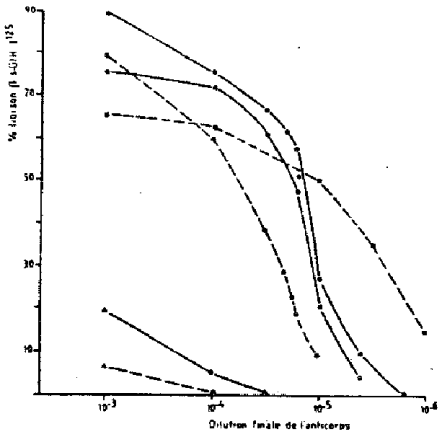

FIGURE 2

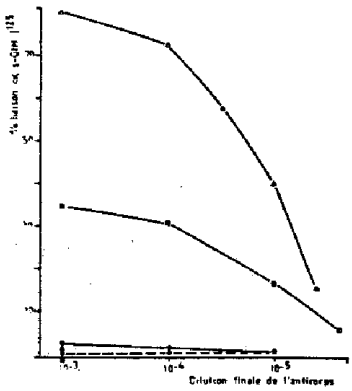

FIGURE 3

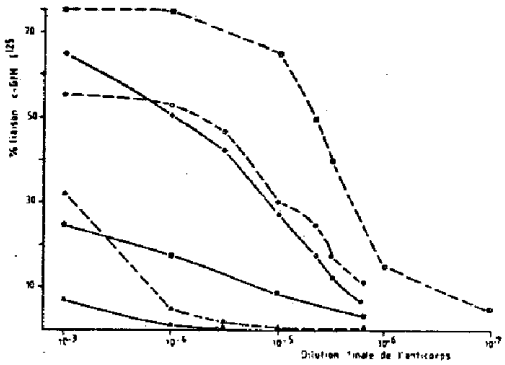

FIGURE 4

COURBE DE LIAISONS DES ANTIGENES IODES, TRAITS CONTINUS SAUMON,
TRAITS DISCONTINUS, CARPES AUX ANTI :

GeH
S GeH
α GeH

4. - Dosage biologique de la GtH de Daurade

Le test de maturation intrafolliculaire des ovocytes de Truite n'a pas pu être utilisé pour la mesure de l'activité biologique des préparations hypophysaires de Daurade à cause du faible contenu gonadotrope de ce matériel et sans doute d'un éloignement phylogénétique trop important des espèces donneuse et receveuse. Un nouveau test basé sur la stimulation gonadotrope in vitro de la sécrétion de 17α-hydroxy-20β-dihydroprogestérone par des follicules de Truite a été mis au point. La sensibilité du dosage a été augmentée en amplifiant le signal du premier messager de la gonadotropine (AMPc) en empêchant sa dégradation par la phosphodiesterase à l'aide d'un bloqueur de cet enzyme le 3-isobutyl-1 methylxanthine (IBMX) (Fostier et Jalabert, 1983). Pratiquement, les follicules sont pré-incubés 2 heures dans un milieu contenant 0.1mM d'IBMX, après addition des extraits gonadotropes, l'incubation est poursuivie 48 heures et la 17α-hydroxy-20β-dihydroprogestérone libérée dans le milieu est dosée par radioimmunologie (Fostier et al., 1981). Ce dosage autorise une sensibilité de 5 ng de GtH/ml.

5. - Traitement avec du LH-RH analogue D Ala 6 - Des Gly 10 - LH-RH

Des Perches soleil conservées au Laboratoire ont été traitées par du LH-RHa seul ou en présence de pimozide. Dans ce cas le traitement pimozide (10 mg/kg) est réalisé 3 heures avant l'injection du LH-RHa (50 µg/kg). Un groupe d'animaux témoins ne reçoit qu'une solution saline. Tous les animaux sont sacrifiés 6 heures après l'injection du LH-RHa. Les hypophyses et les sérums ont été conservés congelés pour la détermination de leur contenu gonadotrope par radioimmunologie.

RESULTATS

1. - Liaison directe des antigènes aux anticorps (figure 1)

La s-GtH se lie aux anti s-GtH et β s-GtH mais aussi à l'anti β c-GtH. Les liaisons maximum sont comprises entre 68 et 76% à la dilution 10^{-3}. La hiérarchie de liaison décroissante est la suivante anti s-GtH - β s-GtH - β c-GtH. Par contre la liaison de cet antigène à l'anti c-GtH est faible 23,5% ainsi qu'aux immunsérums anti sous-unité α des 2 espèces. Les courbes de liaison de la β s-GtH (figure 2) aux anticorps sont comparables à celles obtenues avec la s-GtH native. Les liaisons maximum sont comprises entre 90 et 75%, avec une hiérarchie décroissante suivante, anti β s-GtH - β c-GtH - s-GtH. De plus contrairement à la s-GtH elle se lie à 65% sur un anti c-GtH, mais ne se lie que faiblement aux anti α c-GtH. L'α - s-GtH (figure 3) se lie à 80% avec l'anticorps homologue, la liaison à l'anti s-GtH n'est que de 35% et pratiquement nulle avec tous les autres immunsérums.

Des résultats comparables ont été obtenus avec la c-GtH et ses unités. La figure 4 montre les courbes de liaison de la c-GtH, on retrouve une hiérarchie de liaison parallèle à celle obtenue avec la s-GtH, soit en ordre décroissant anti c-GtH - β s-GtH - β c-GtH - α c-GtH - s-GtH - α s-GtH. Les hiérarchies de liaison de la β c-GtH sont similaires à celles de la β s-GtH. Elle se lie aussi à l'anti s-GtH contrairement à l'hormone native. L'α c-GtH ne se lie qu'à l'anti c-GtH et l'anti α c-GtH.

2. - Etude des compétitions

- par les antigènes purifiés

systèmes IS - s-GtH I^{125} (tableau 1)

Dans le système homologue anti s-GtH - s-GtH I^{125} la pente de la droite de compétition par l'hormone correspondante froide (logit B/B_0 = f (log dose) est de - 0.79. Seules les sous-unités β s et c déplacent spécifiquement le système. Par contre la c-GtH n'induit pas de compétition spécifique.

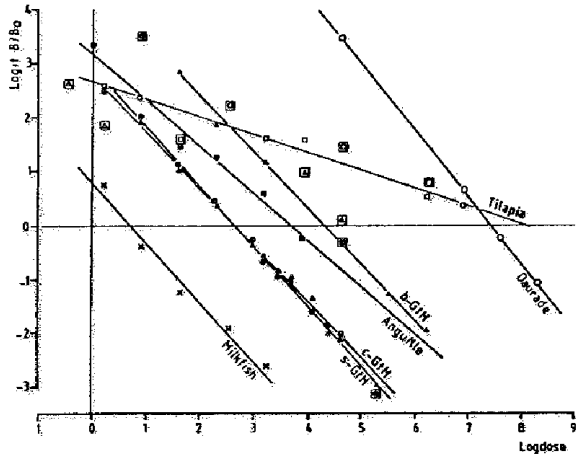

FIGURE 5 :

COURBES DE COMPETITION DE PREPARATIONS GONADOTROPES HYPOPHYSAIRES DANS LE SYSTEME ANTI β-c-GtH - s-GtH I^{125}

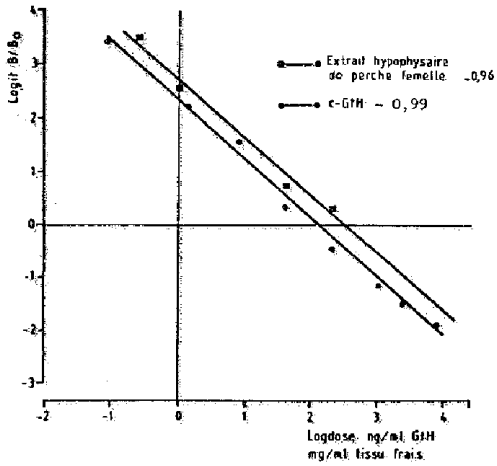

FIGURE 6 :

COURBES DE COMPETITION DE LA c-GtH ET D'UN EXTRAIT HYPOPHYSAIRE DE PERCHE SOLEIL DANS UN SYSTEME ANTI β s-GtH - c-GtH I^{125}

Dans le système anti β s-GtH - s-GtH I^{125} la liaison de la s-GtH est spécifiquement déplacée par la s-GtH, la β s-GtH ($p < 0.01$) et à un moindre degré ($p < 0.05$) par la c et β c-GtH.

Dans le système anti β c-GtH - s-GtH I^{125} des droites de compétitions parallèles sont obtenues avec les 2 hormones natives et leurs sous-unités β. Les liaisons trop faibles de la s-GtH I^{125} aux IS α s-GtH - c-GtH - α c-GtH n'autorisent pas d'études de compétition.

Systèmes IS β s-GtH I^{125} (tableau 2)

Dans tous les systèmes liant initialement la β s-GtH; les 2 hormones natives c-GtH et s-GtH, ainsi que leurs sous-unités β déplacent spécifiquement la liaison de β s-GtH I^{125} aux anti-hormones totales et anti sous-unités β. Par contre, les sous-unités α n'entrent pas en compétition avec la β s-GtH I^{125} dans ces systèmes pas plus qu'il n'est possible d'étudier les systèmes IS anti α - β s-GtH I^{125} cette dernière ne se liant pas aux anti α sous-unités.

- Par les GtH partiellement purifiées et les extraits hypophysaires

Systèmes IS - s-GtH I^{125} (tableau 3)

La GtH de Brochet partiellement purifiée déplace spécifiquement les systèmes anti s-GtH - s-GtH I ^{125} et anti β s-GtH - s-GtH I ^{125} dans lesquels les teneurs en GtH de la préparation, exprimée en équivalent s-GtH, sont respectivement de 0,82 et 0,85 µg/µg de protéine hormonale. Ces 2 systèmes sont également spécifiquement déplacés par l'extrait hypophysaire d'Anguille qui contient 2,8 µg d'équivalent s-GtH par mg d'une poudre acétonique. Pour l'extrait hypophysaire de Daurade seul le système anti s-GtH s-GtH ^{125} permet de mesurer la GtH hypophysaire dans cette espèce de même qu'un système hétérologue anti β c-GtH - s-GtH I ^{125} est le seul spécifiquement déplacé par l'extrait hypophysaire de milkfish. Aucun de ces systèmes n'est déplacé par l'extrait d'hypophyse de Tilapia. La figure 5 visualise les différentes courbes de compétition obtenues dans le système hétérologue anti β c-GtH - s-GtH I^{125}, qui autorise apparemment la plus grande diversité de reconnaissance immunologique d'activités de type gonadotrope.

Systèmes IS - β s-GtH I^{125} (tableau 4)

La GtH partiellement purifiée déplace spécifiquement la liaison de la β s-GtH I^{125} à l'anti s-GtH mais aussi aux anti c et β c-GtH. Dans ces 3 systèmes les contenus en équivalent en s-GtH de la préparation sont voisins 0.59, 0.63 et 0.70 µg/µg de protéine ils sont inférieurs à ceux mesurés dans les systèmes précédents mais restent supérieurs à ceux obtenus lors de la détermination de son activité biologique 0,38 ± 0,12. Seul le système anti β s-GtH - β s-GtH I^{125} est spécifiquement déplacé par l'extrait hypophysaire de Daurade, mais aussi par ceux d'Anguille, de Tilapia et de Xénope.
L'extrait hypophysaire d'Anguille induit aussi une compétition spécifique dans le système anti β c-GtH - β s-GtH I^{125}. Dans tous les systèmes spécifiquement déplacés par cet extrait, la teneur en GtH mesurée en équivalent s-GtH est comprise entre 2,708 et 3,088 µg/mg.

3. - Application à la purification de la GtH de Daurade, validation biologique

L'activité gonadotrope des fractions protéiques obtenues après chromatographie sur ultrogel ACA 54 a été mesurée par dosage biologique et immunologique dans les systèmes décrits précédemment. Les résultats sont montrés dans le tableau 4. C'est dans le système anti β s-GtH - β s-GtH I ^{125} que les valeurs obtenues (en équivalent s-GtH) sont les plus proches de celles mesurées par dosage biologique, bien que restant la plupart du temps inférieures. Le rapport des activités immunologiques et biologiques est voisin de 0,75 sauf pour la fraction 29 pour laquelle l'activité mesurée par R.I.A. est supérieure à celle déterminée par essai biologique. Dans ce système les pentes des droites de compétition de chaque fraction restent parallèles à celle de la droite de référence correspondant à la

TABLEAU 1 : Pente des courbes d'inhibition de différentes préparations gonadotropes dans les systèmes IS anti-gonadotrope s-GtH I 125

ANTICORPS \ COMPETITEUR	s-GtH	β s-GtH	α s-GtH	c-GtH	β c-GtH
anti s-GtH	- 0,79	- 0,92	/	- 0,43	- 0,75
anti β s-GtH	- 0,82	- 0,78		- 0,67	0,61
anti α s-GtH					
anti c-GtH					
anti β c-GtH	- 1,08	- 0,95		- 1,07	- 1,02

TABLEAU 2 : Pente des courbes d'inhibition de différentes préparations gonadotropes dans les systèmes IS anti-gonadotrope β s-GtH I 125

ANTICORPS \ COMPETITEUR	s-GtH	β s-GtH	α s-GtH	c-GtH	β c-GtH
anti s-GtH	- 1.04	- 0.82	/	- 0.73	- 0.94
anti β s-GtH	- 0.92**	- 1.02	- 0.04	- 0.96	- 0.87
anti α s-GtH					
anti c-GtH	- 0,85*	- 0,88	/	- 1.14	- 1.12
anti β c-GtH	- 1,10*	- 1.12	- 0.23	- 1.08	- 1.24

TABLEAU 3 : PENTE DES COURBES D'INHIBITION DE c-GtH PURIFIEES ET D'EXTRAITS HYPOPHYSAIRES DANS LES SYSTEMES IS ANTI-GONADOTROPINES - s-GtH I^{125}
LES CONTENUS EN GtH SONT EXPRIMES EN EQUIVALENT s-GtH

	s-GtH	c-GtH	b-GtH	DAURADE	ANGUILLE	MILKFISH	TILAPIA
anti s-GtH	- 0.79	- 0.43	- 0.86 0,82	- 0.94 10.72	- 1.10 2883	- 0.36	- 0.34
anti β s-GtH	- 0.82	- 0.67	- 0.99 0.85	- 1.30	- 1.03 2708	- 0.41	- 0.26
anti β c-GtH	- 1.08	- 1.07	- 1.03	- 1.24	- 0.87	- 1.06 73.10	- 0.33
			µg/µg	ng/µg	ng/mg	ng/mg	

TABLEAU 4 : PENTE DES COURBES D'INHIBITION DE c-GtH PURIFIEES ET D'EXTRAITS HYPOPHYSAIRES DANS LES SYSTEMES IS ANTIGONADOTROPE β-s-GtH I^{125}
LES CONTENUS EN GtH SONT EXPRIMES EN EQUIVALENT s-GtH.

	s-GtH	c-GtH	b-GtH	DAURADE	ANGUILLE	MILKFISH	TILAPIA	XENOPE
anti s-GtH	- 1.12	- 1.33	- 1.23 0,59	- 0.74	- 0.61	- 0.24	- 0.18	- 0.09
anti βs-GtH	- 1.34	- 0,78	- 1.25 - 0.71	- 1.16 29,88	- 0.99 3088	- 0.43	- 0.97 79,17	- 0.88 34.65
anti c-GtH	- 0.85	- 1.14	- 0,95 0.63	- 0.68	- 0,72	- 0.13	- 0.21	
anti βc-GtH	- 0.96	- 1,15	- 1.10 0,70	- 0.64	- 0.91 2822	- 0.31	- 0.30	- 0.04

TABLEAU 5 : ACTIVITE IMMUNOLOGIQUE EQUIVALENT ng s-GtH/µg de PROTEINE

FRACTION N°	ACTIVITE BIOLOGIQUE EQUIVALENT s-GtH PAR ng de PROTEINE	s - GtH I^{125}		β - s-GtH I^{125}			
		IS - s-GtH		IS βc-GtH		IS βs-GtH	
29	31	18.5	- 1.10	17.9	- 1.08	33.6	- 1.25
30		27.7	- 0.73	17.5	- 0.77	31.5	- 1.06
31	58	36.2	- 0.99	33.05	- 0.75	40.61	- 1.12
32	43	30	- 0.76	37.1	- 1.08	36.64	- 1.30
33	38	23.7	- 0.99	30.8	- 0.59	28.2	- 1.20
34	15	14.3	- 0.99	11.83	- 0.89	11.3	- 1.18
35	8.33	6.3	- 0.30	9.98	- 0.77	6.24	- 0.80
36	< 4	N.D.		N.D.		N.D.	
pente de référence		- 1.04		- 0.83		- 1.10	

TABLEAU 6 : DOSAGE DE LA GtH CHEZ LA PERCHE SOLEIL APRES STIMULATION PAR LE EH-RH A SEUL OU EN PRESENCE DE PIMOZIDE
VALEURS ESTIMEES PAR RAPPORT A LA c-GtH DANS LE SYSTEME IS β s-GtH - c-GtH - c-GtH
PENTE DE LA DROITE DE REFERENCE - 0,99

N°	SEXE	R G S		P E A S M A	
				GtH ESTIMEE ng/ml	PENTE DROITE DE REGRESSION
1	♂	1.81	spermiant	0.55	- 0.63
2	♀	0.62		0.55	
3	♀	0.69		0.50	- 0.58
4	♀	14.71		0.90	- 0.55
5	♂	0.37		0.90	- 0.65
6	♀	0.83		1.51	- 0.67
7	♀	24.19		1.54	- 0.78
8	♂	2.08	spermiant	1.23	

s-GtH. Dans tous les autres systèmes à un degré moindre dans le système anti s-GtH - s-GtH I ^{125} dont la "spécificité" pour un facteur hypophysaire de Daurade a été démontré précédemment, les pentes de ces droites ne sont pas constantes tout au long du chromatogramme, et les concentrations en GtH des fractions sont sous-estimées comparées aux résultats des dosages biologiques. Le dosage n'a pas été validé pour le dosage de la GtH dans le plasma de la Daurade, c'est-à-dire par la mesure de modifications naturelles ou expérimentales des concentrations périphériques de GtH. Ces systèmes le permettent cependant. Ainsi le système anti β s-GtH - c-GtH I^{125} s'est révélé être déplacé spécifiquement par un extrait hypophysaire de Perche soleil (figure 6). Les pentes des droites de régression logit B/B_0 = f logdose correspondant à la c-GtH et l'extrait sont respectivement de - 0.99 et - 0.96. Le tableau 6 montre les mesures de GtH plasmatique dans un groupe de Perches traitées par une solution saline : animaux 1.2.3., un d Ala ^{6} DesGly 10 - LH-RH : animaux 4, 5 ; et une combinaison de pimozide LH-RHa : animaux 6.7.8. Les pentes des droites de régression correspondant au plasma de chacun de ces animaux ne sont pas statistiquement différentes entre elles, mais diffèrent de la droite de référence correspondant à la c-GtH et de celle, caractéristique du déplacement induit par l'extrait hypophysaire. Les plus fortes valeurs de GtH plasmatique sont obtenues chez les animaux traités par le pimozide et le LH-RHa et les plus faibles chez les animaux qui ne reçoivent que la solution saline.

D I S C U S S I O N

Ces résultats apportent à la fois de nouveaux éléments fondamentaux sur les relations structure - activité immunologique des gonadotropines de poissons, et élargissent à d'autres espèces, les possibilités d'utiliser des systèmes de dosages hétérologues pour le dosage de leurs GtH spécifiques à condition toutefois de valider les systèmes retenus, démarche qui n'a pu être conduite à son terme chez la Daurade par manque de matériel biologique. Une approche comparable à celle mise en oeuvre chez la Perche est envisagée.

Ainsi que l'avaient démontré Dufour et al., 1979 ; Burzawa-Gerard et al., 1980 pour les sous-unités de la c-GtH, nous retrouvons des caractéristiques immunologiques comparables pour les sous-unités α et β de la GtH de Saumon. La sous-unité α possède une spécificité zoologique très stricte alors que celle des déterminants antigéniques des sous-unités β l'est beaucoup moins. Il ne s'agit cependant pas d'une aspécificité totale, il doit exister des différences à l'intérieur même du groupe des poissons, les divers extraits hypophysaires s'ils entrent tous en compétition ne le font pas tous de la même façon dans les systèmes anti β ou qui mettent en jeu un seul de ces composants. Une telle étude ne permet aucune évaluation des distances phylogénitiques entre les espèces considérées, comme l'ont d'ailleurs montré d'autres travaux (Bye et al., 1980 - revue de Licht et al., 1977). Ces travaux montrent également qu'il existe une parenté immunologique entre la sous-unité β de s-GtH et un facteur "gonadotrope" présent dans l'hypophyse d'un amphibien le Xénope, laissant supposer une certaine conservation des déterminants antigéniques β entre ces 2 classes de vertébrés comme entre poissons et mammifères (Burzawa-Gerard et al., 1980). Les hormones s-GtH et c-GtH bien que purifiées à partir d'un test biologique sur poisson sont actives à la fois sur l'induction in vitro de la maturation d'ovocytes de Xénope (Breton et Schuetz, données non publiées) et sur la stimulation de la stéroidogénèse testiculaire dans cette même espèce (Boujard, 1982), ce qui fait apparaître des analogies fonctionnelles de ces hormones chez les Amphibiens et les Poissons (revue de Idler, 1982). Si comme on l'admet chez les mammifères la spécificité d'action biologique fonctionnelle est liée à la sous-unité β, cette caractéristique est préservée dans les GtH de poissons, et d'amphibiens, les communautés antigéniques entre sous-unités β pourraient aussi être le reflet de communautés d'action biologique.

Sur un plan plus pratique, il a été possible en utilisant des systèmes hétérologues homospécifique Saumon ou hétérospécifique Saumon - Carpe d'en trouver un ou plusieurs spécifiquement déplacés par chacun des 5 extraits hypophysaires de poissons téléostéens utilisés. Quand plusieurs systèmes reconnaissent un facteur hypophysaire, les teneurs hypophysaires en ce facteur mesurées sur les différents systèmes sont voisines : cas de l'extrait hypophysaire d'Anguille et des GtH partiellement purifiées de Brochet et Daurade. Dans ce dernier cas la constance de la pente des droites de régression, traduisant les compétitions induites par chaque fraction, laisse supposer que c'est bien le même facteur qui est mesuré par R.I.A. tout le long du chromatogramme et qu'il n'y a pas interférence d'autres facteurs hormonaux hypophysaires de type TSH en particulier, que le gel filtration sur ultrogel ACA 54 ne permet pas de séparer de la GtH. La comparaison des activités biologiques et immunologiques renforce cette hypothèse. La validation du dosage pour la détermination de la GtH hypophysaire, n'implique pas obligatoirement une validation dans le plasma. Ainsi le système anti β s-GtH - c-GtH I^{125} est spécifiquement déplacé par un extrait hypophysaire de Perche, mais les droites de régression traduisant les compétitions en présence de dilutions sériées des plasmas ne sont pas parallèles aux références. Ce résultat traduit sans doute l'existence d'une réaction d'aspécificité constante en présence de plasma, les pentes étant parallèles entre tous les plasmas. Ce dernier élément pourrait cependant autoriser, à la condition de travailler à une dilution constante des plasmas, une "estimation" de leurs concentrations en GtH que le sens des variations induites après traitements LH-RHa peut aussi corroborer. Ces variations sont en accord avec celles observées dans d'autres espèces (Chang et Peter, 1982; Billard et al., 1983), mais leur amplitude est plus faible aboutissant cependant à un triplement des niveaux de base. On pourrait supposer que comme chez le poisson rouge (Gillet et al., 1981) le jeûne auquel les Perches ont été soumises durant leurs 3 semaines de captivité aboutit à une diminution de la sécrétion de GtH, mais aussi à celle de la réceptivité hypophysaire à des stimulations par le LH-RHa. En conclusion ce travail montre qu'il paraît sans doute possible parmi tous les systèmes proposés, d'en trouver un suffisamment spécifique pour la détermination de GtH d'espèces chez lesquelles elle n'est pas encore purifiée, cependant la validation du dosage dans le plasma pourrait nécessiter l'utilisation de sérum d'animaux hypophysectomisés, opération difficilement réalisable dans certaines espèces.

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été supporté par l'I.N.R.A., le C.N.E.X.O., contrat 82/2678Y. Il a aussi bénéficié de l'aide de la Fondation Rotschild qui a permis le séjour de l'un des auteurs (Y. Zohar) au laboratoire.

Nous remercions le Docteur E. Gordin, Directeur de la Station de Mariculture de l'I.O.L.R. à Eilat (Israël) qui a organisé la collecte des hypophyses de Daurade, ainsi que les Docteurs A. Fostier et B. Jalabert pour les déterminations des activités biologiques des préparations, Mademoiselle Bougoussa et Monsieur Thomas ont assuré la réalisation technique de ce travail, Madame Bouix a réalisé la dactylographie de ce manuscrit, nous les en remercions.

L'expérimentation sur Perche a été réalisée dans le laboratoire du Docteur R.E. Peter avec l'aide du N.R.C.S. du Canada.

Billard R., Alagarswami K., Peter R.E., Breton B., 1983 - Potentialisation par le pimozide des effets du LH-RHa sur la sécrétion gonadotrope hypophysaire, l'ovulation et la spermiation chez la Carpe commune Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 296, p. 181-184.

Boujard D., 1982 - Etude in vivo et en périfusion, du contrôle de la stéroïdogénèse testiculaire par les gonadotropines chez les Amphibiens. Thèse de 3ème cycle - Université de Rennes I.

Breton B., Kann G., Burzawa-Gerard E., Billard R., 1981 - Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de Carpe Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 272, p. 1515-1517.

Breton B., Billard R., Jalabert B., 1972 - Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques poissons téléostéens. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 13, p. 347-362.

Breton B., Jalabert B., Fostier A., Billard R., 1975 - Etude sur le cycle reproducteur de la Truite et de la Tanche : effets de variations expérimentales de la température. J. Physiol., 70, p. 561-564.

Breton B., Prunet P., Reinaud P., 1978 - Sexual differences in salmon gonadotropin. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 18, p. 754-765.

Breton B., 1981 - A study of salmo Oncorhynchus tschawytscha pituitary gonadotropin dissociation. Gen. Comp. Endocrinol., 45, p. 147-152.

Burzawa-Gerard E., 1974 - Séparation et réassociation des sous-unités de l'hormone gonadotrope d'un poisson téléostéen, la Carpe Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 279, p. 1681-1684.

Burzawa-Gerard E., Kerdelhue B., 1978 - Etude par radioimmunologie des propriétés des immunsérums de l'hormone gonadotrope de la Carpe Cyprinus carpio et de ses sous-unités. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 18, 4, p. 773-780.

Burzawa-Gerard E., Dufour S., Fontaine Y.A., 1980 - Relations immunologiques entre les hormones glycoprotéique hypophysaires de poissons et de mammifères ainsi qu'entre leurs sous-unités α et β. Gen. Comp. Endocrinol., 41, p. 199-211.

Bye V.J., Breton B., Billard R., 1980 - Immunological cross-reaction between pituitary gonadotropin for North Atlantic fish. Gen. Comp. Endocrinol., 41, p. 130-134.

Chang J.P., Peter R.E., 1983 - Effects of pimozide and des Gly ^{10}(D ala ^{6}) luteinizing hormone releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentrations, germinal vesicle migration and ovulation in female goldfish, Carassius auratus. Gen. Comp. Endocrinol. sous presse.

Crim L.W., Meyer A.K., Donaldson E.M., 1973 - Radioimmunoassay estimates of plasma gonadotropin levels in the spawning pink salmon. Gen. Comp. Endocrinol., 21, p. 69-76.

Dufour S., Burzawa-Gerard E., Fontaine Y.A., 1979 - Evolution des hormones glycoprotéiques hypophysaires : données radioimmunologiques sur les sous-unités de l'hormone gonadotrope de la Carpe Cyprinus carpio L. C.R. Acad. Sci., 289, 137-140.

Dufour S., Delerue-le Belle N., Fontaine Y.A., 1983 - Development of a heterologous radioimmunoassay for eel Anguilla anguilla gonadotropin. Gen. Comp. Endocrinol., 49, p. 404-413.

Fontaine Y.A., Salmon C., Fontaine-Bertrand E., Burzawa-Gerard E., Donaldson E. M., 1972 - Comparison of the activities of two purified fish gonadotropins on

adenyl-cyclase activities of the goldfish ovary. Can. J. Zool., 50, p. 1673-1676.

Fostier A., Jalabert B., Campbell C., Terqui M., Breton B., 1981 - Cinétique de libération in vitro de 17 -hydroxy-20 -dihydroprogestérone par des follicules de Truite arc-en-ciel Salmo gairdneri. C.R. Acad. Sci., 292, p. 777-780.

Fostier A., Jalabert B., 1983 - Mise au point d'un dosage biologique pour la mesure des activités gonadotropes hypophysaires. Reprod. Nutr. Devel. sous presse.

Gillet C., Billard R., Breton B., 1981 - La reproduction du poisson rouge Carassius auratus élevé à 30°C. Effets de la photopériode, de l'alimentation et de l'oxygénation. Cah. Lab. Montereau., 11, p. 49-56.

Idler D.R., 1982 - Some perspectives on fish gonadotropins. Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Wageningen the Netherlands, C.J.J. Richter, H.J. Th. COOS, Editors) Pudoc p. 4-13.

Jalabert B., Breton B., Billard R., 1974 - Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test de maturation in vitro des ovocytes de Truite. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 14, p. 217-228.

Licht P., Papkoff H., Farmer S.W., Muller C.H., Tsui H.W., Crews D., 1977 - Evolution of gonadotropin. Structure and function. Recent Progress in Hormone Research., 33, p. 169-248.

Lowry O.H., Rosebrough N.S., Farr A.L., Randall R.S., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, p. 265-275.

NG. T.B., Idler D.R., 1978 - Big and little forms of plaice vitellogenic and maturational hormones. Gen. Comp. Endocrinol., 34, p. 408-420.

SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G., 1957 - "Statistical methods". State Univ. Press. Ames.

Tan E.S.P., Dodd J.M., 1978 - Immunological relatedness of gonadotrophins of various fishes as shown by radioimmunoassays. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys., 18, p. 781-785.

ACTES DE COLLOQUES
n° 1 1985

BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE

MONTPELLIER

12-16 DÉCEMBRE 1983

IFREMER

CNRS
PIROCEAN

ACTES DE COLLOQUES N° 1

BASES BIOLOGIQUES DE L'AQUACULTURE

MONTPELLIER
12-16 DÉCEMBRE 1983

— 1985 —