



HAL
open science

Mise au point d'un dosage biologique sensible pour la mesure des activités gonadotropes hypophysaires

Alexis Fostier, Bernard Jalabert

► To cite this version:

Alexis Fostier, Bernard Jalabert. Mise au point d'un dosage biologique sensible pour la mesure des activités gonadotropes hypophysaires. L'aquaculture du Bar et des Sparidés: Actes du colloque sur l'aquaculture du Bar (loup) et des Sparidés tenu à Sète (France) les 15, 16 et 17 mars 1983, INRA Publi., 542 p., 1984, Hydrobiologie et Aquaculture. hal-02858436

HAL Id: hal-02858436

<https://hal.inrae.fr/hal-02858436>

Submitted on 8 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

Mise au point d'un dosage biologique sensible pour la mesure des activités gonadotropes hypophysaires

A. FOSTIER et B. JALABERT

*INRA, Laboratoire de Physiologie des Poissons,
Campus de Beaulieu, F35042 Rennes Cedex*

Résumé

L'estimation de l'activité gonadotrope d'une préparation d'origine hypophysaire peut être faite, de façon très spécifique, à l'aide d'un dosage biologique utilisant l'induction, sur l'ovaire de truite arc-en-ciel incubé *in vitro*, de la maturation méiotique ovocytaire (Jalabert *et al.*, 1974). Cependant, dans le cas d'activités faibles, telles celles que nous avons rencontrées dans des hypophysés de daurade, la sensibilité de ce dosage peut se révéler insuffisante. Aussi avons-nous développé un dosage biologique reposant sur le mécanisme endocrinien conduisant à la maturation méiotique, c'est-à-dire la stimulation de la synthèse du stéroïde sexuel maturant (17α -hydroxy- 20β -dihydroprogestérone) par la gonadotropine *in vitro*. Pour augmenter la réponse observée, nous avons amplifié le signal du premier messager de la gonadotropine (c'est-à-dire l'adénosine monophosphate cyclique, AMPc) en empêchant sa dégradation (par la phosphodiesterase) à l'aide d'un bloqueur chimique (le 3-isobutyl-1-méthylxanthine). Cette technique nécessite de disposer d'une méthode de dosage du stéroïde maturant. Cependant, elle permet, à partir d'un seul échantillon, d'estimer des quantités de gonadotropine de quelques nanogrammes en équivalent GtH de saumon. Nous l'avons appliquée à la mesure d'activités gonadotropes d'hypophysés de daurade.

A côté du développement de techniques biochimiques d'analyse directe des hormones hypophysaires de poisson, les dosages biologiques gardent des caractéristiques originales qui en font tout leur intérêt. D'une part, ils sont indispensables à l'identification des fractions actives lors de la purification de ces hormones. D'autre part, ils permettent d'estimer les activités réelles des différentes formes moléculaires reconnues par les analyses biochimiques, tel le dosage radioimmunologique. Par ailleurs, un dosage biologique permet d'estimer l'activité globale, bilan de synergies diverses, d'extraits hypophysaires utilisés pour les inductions de ponte (Yaron *et al.*, 1983). Dans ce dernier cas, il est préférable de choisir l'observation d'un phénomène biologique directement lié au processus de ponte. Le test de maturation intrafolliculaire *in vitro* des ovocytes de truite répond parfaitement à ce critère

(Jalabert *et al.*, 1974), puisqu'il consiste à suivre la reprise de la maturation méiotique, sous l'action de la gonadotropine, dans des ovocytes prélevés en fin de vitellogenèse (peu de temps avant la date d'ovulation spontanée), prélevés et incubés dans leurs follicules. Cette reprise de la méiose (division permettant à la cellule germinale de réduire son stock chromosomique de moitié) peut être suivie, dans des conditions particulières d'incubation *in vitro*, d'une ovulation (rupture du follicule ovarien et expulsion de l'ovule) normale (Jalabert, 1978). Le test repose sur l'observation des pourcentages de maturation *in vitro* (critères morphologiques) en réponse à une série de dilutions croissantes de l'extrait hypophysaire à doser, selon un principe déjà proposé par Thornton (1971) chez le Xenope. La courbe de réponse sigmoïde obtenue permet de déterminer la dose théorique capable d'induire la maturation de 50 p. 100 des ovocytes placés en incubation, ou dose efficace à 50 p. 100 (DE 50), soit graphiquement, soit après linéarisation par une transformation appropriée (Jalabert *et al.*, 1974). Pour obtenir une précision suffisante, il est cependant nécessaire de faire agir les dilutions de l'extrait à doser sur des échantillons numériquement représentatifs de follicules, ce qui exige d'utiliser l'équivalent de 5 à 10 μg de GtH au minimum. Lorsque les hypophyses sont pauvres en GtH et que le matériel disponible est rare, et compte tenu de la sensibilité variable du test selon le stade de la truite donneuse d'ovocytes, le test de maturation peut être pratiquement inutilisable. Cependant la modification de certaines conditions d'incubation permet encore de multiplier par quatre la sensibilité des follicules (Jalabert, non publié). Dans l'étude présente, nous avons choisi d'analyser une autre phase de la réponse ovarienne, intermédiaire entre l'action de la GtH et la maturation méiotique de l'ovocyte. Il est en effet maintenant démontré que l'action de la gonadotropine sur la maturation ovocytaire passe par l'intermédiaire de la sécrétion d'une hormone stéroïdienne, très probablement la 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogestérone (17α , 20β -OH-P) (Jalabert, 1976; Fostier *et al.*, 1981). C'est donc l'analyse de la sécrétion folliculaire de ce stéroïde qui peut être retenue comme moyen d'estimation d'une activité gonadotrope. La sensibilité de ce nouveau test peut par ailleurs être augmentée en amplifiant la réponse. Pour cela on utilise le fait qu'un relais connu de l'action de la GtH sur le follicule est la stimulation d'un système enzymatique membranaire, l'adényl-cyclase (Fontaine *et al.*, 1970, 1972). Cette stimulation se traduit donc par la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Idler *et al.*, 1975), facteur intracellulaire rapidement détruit par une phosphodiesterase. Il est possible d'amplifier la réponse à la GtH en bloquant la disparition de ce premier relais intracellulaire, à l'aide d'un inhibiteur de la phosphodiesterase, la 3-isobutyl-1-méthylxanthine (Idler *et al.*, 1975; Bogonolmaya et Yaron, 1982). C'est ce procédé que nous avons appliqué à la mise au point d'un dosage biologique reposant sur l'analyse de la sécrétion du stéroïde maturant par l'ovocyte de truite arc-en-ciel sous l'action d'une gonadotropine.

Matériel et méthodes

Matériel biologique: le stade de l'ovogenèse est apprécié par l'observation, sous loupe binoculaire, de l'état de migration du noyau dans l'ovocyte (Jalabert, 1978; Bry, 1981). Les ovocytes utilisés dans cette étude présentaient un noyau en position subpériphérique.

L'hormone gonadotrope de référence est une hormone de saumon, *Oncorhynchus tshawytscha*, hautement purifiée (Breton *et al.*, 1976).

Dosage de la 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone: il est fait par radio-immunologie selon une technique déjà décrite (Fostier *et al.*, 1981).

Cultures: les ovocytes sont répartis dans des piluliers à raison de 25 pour 4 ml de milieu minéral isotonique supplémenté en glucose (1 p. 1 000) (Jalabert, 1976), avec ou sans antibiotique (Penistrepto : pénicilline 100 000 UI/l + streptomycine 1 g/l). Une préincubation de 2 h est faite dans le milieu contenant la 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX, SIGMA) avant addition de l'hormone gonadotrope. Le milieu et les follicules, débarrassés mécaniquement de la masse vitelline de l'ovocyte dans une solution de KCl 10 p. 1 000 sont collectés après 48 h d'incubation à 12 °C sous agitation douce.

Résultats

1. *Effets de différentes concentrations d'IBMX sur la sécrétion de 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone*: dans cette expérience, seule la libération du stéroïde maturant dans le milieu de culture a été mesurée. On observe une amplification de la réponse aux différentes concentrations d'IBMX essayées (0,1 - 0,2 - 0,5 et 1 mM), bien qu'elle soit moins importante avec la plus forte (1 mM). La meilleure résolution (plus forte pente) des réponses en fonction des doses de GtH est obtenue pour la plus faible concentration d'IBMX (0,1 mM) (fig. 1).

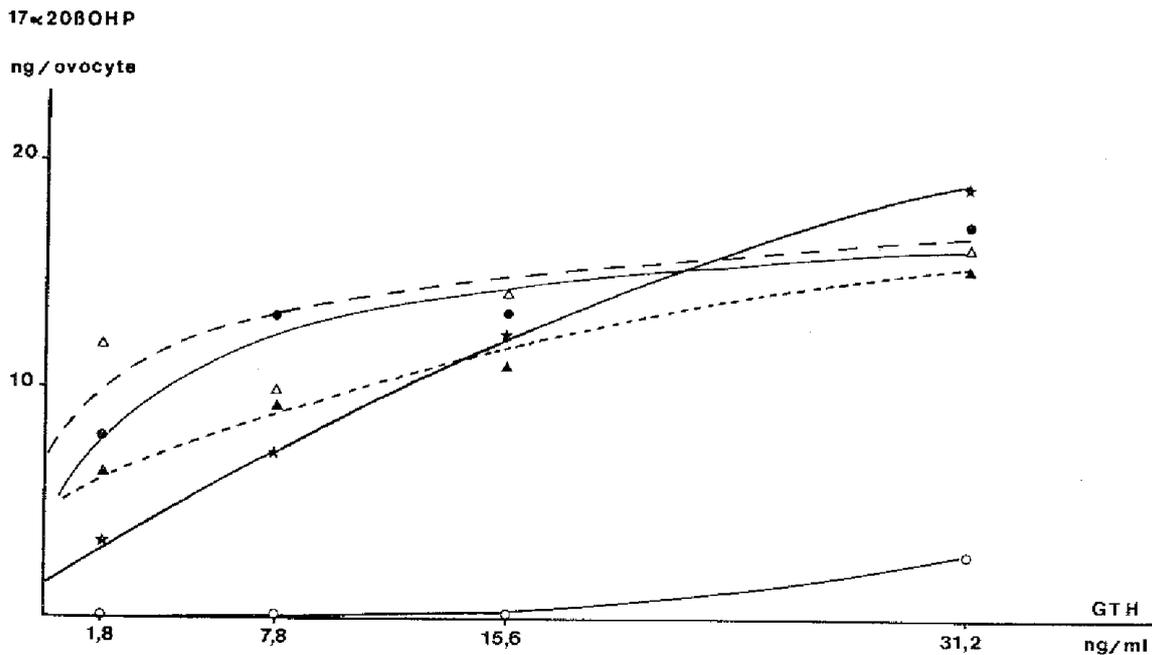


Figure 1. — Libération dans les milieux de culture *in vitro* de 17 α -20 β -OH-P par des follicules ovariens de truite arc-en-ciel sous l'action de doses croissantes de s-GtH et en présence de différentes concentrations d'IBMX (○-○-○ témoin ; ★-★-★ 0,1 mM ; ●-●-● 0,2 mM ; Δ-Δ-Δ 0,5 mM ; ▲-▲-▲ 1 mM), après 48 h d'incubation à 12 °C. La s-GtH est ajoutée après 2 h de préincubation en présence d'IBMX.

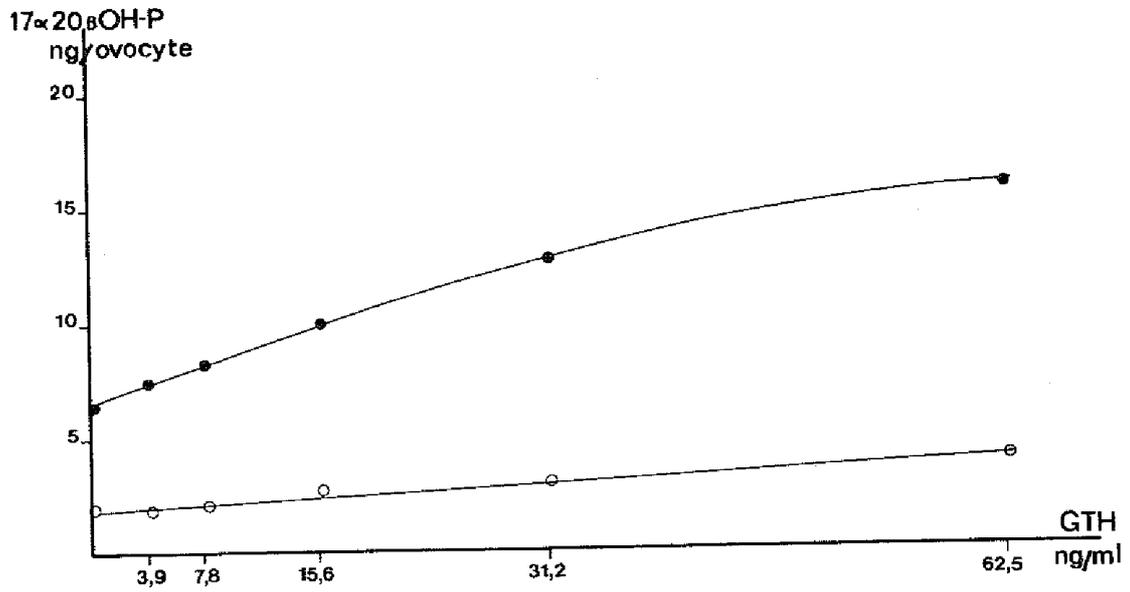


Figure 2. — Concentrations de 17α - 20β -OH-P, dans le milieu (●-●-●) et dans les follicules ovariens (○-○-○) de truite, cultivés 48 h en présence d'IBMX (0,2 mM) et de différentes doses de s-GtH.

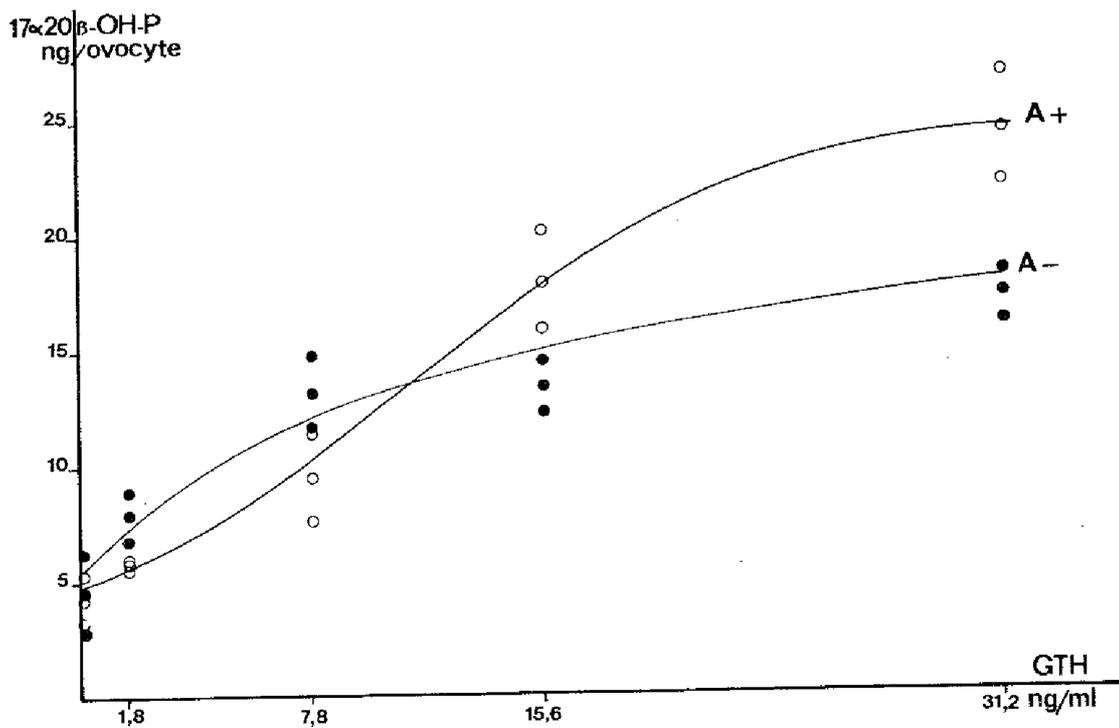


Figure 3. — Effet des antibiotiques (Penistrepto), sur la libération de 17α - 20β -OH-P par des follicules de truite cultivés *in vitro* en présence d'IBMX (0,2 mM) et de différentes doses de s-GtH. (●-●-● milieu sans antibiotique ; ○-○-○ milieu avec antibiotiques.)

2. *Comparaison des mesures de 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone dans le milieu de culture et intrafolliculaires*: les quantités, rapportées à l'ovocyte, sont de trois à quatre fois plus faibles dans les follicules que dans les milieux de culture. Par ailleurs, la pente de la réponse en fonction des doses croissantes de GtH est plus faible lorsque sont prises en compte les quantités intrafolliculaires (fig. 2).

3. *Effets des antibiotiques sur la sécrétion de 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone*: afin d'éviter les contaminations bactériennes, les cultures sont généralement conduites en présence d'antibiotiques. Si l'on compare les sécrétions obtenues dans de telles cultures (en présence d'IBMX 0,2 mM) à celles obtenues dans des cultures sans antibiotique, réalisées en conditions stériles, une réponse plus importante à l'action de la GtH est observée en absence d'antibiotiques (fig. 3).

Discussion

La sécrétion de 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone par des ovocytes de truite arc-en-ciel sous l'action de la GtH est une fonction continue croissante des doses d'hormones utilisées. Elle est par ailleurs amplifiée par un inhibiteur de la phosphodiesterase, l'IBMX, en particulier lorsqu'il est utilisé à faible concentration. Le phénomène peut être exploité comme dosage biologique de faibles activités gonadotropes. La présente étude nous conduit à proposer les conditions suivantes d'utilisation de ce test: culture de 25 ovocytes pour 4 ml de milieu (Jalabert, 1976) dépourvu d'antibiotique; présence d'IBMX à la concentration de 0,1 à 0,2 mM; préincubation de 2 h avant l'addition des hormones hypophysaires; mesure de la sécrétion de 17 α -20 β -OHP dans le milieu.

Dans ces conditions, il est possible de travailler avec des concentrations en GtH comprises entre 5 et 100 ng/ml. La sensibilité du test dépend, comme pour le test de maturation, du stade précis des ovocytes utilisés. Afin d'être assuré d'une réponse suffisante, il est prudent d'effectuer 2 prélèvements de milieu; l'un à 48 h et l'autre à 72 h (Fostier *et al.*, 1981).

Le test nous a permis de suivre les premières étapes de purification de gonadotropine de daurade (Breton et Zohar, non publié). Des aliquotes de fractions de purification contenant des activités, en équivalents s-GtH, comprises entre 22 et 57 ng ont pu être dosés.

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'aide technique précieuse de M^{me} O. Marcuzzi. Il a été financé dans le cadre de la convention CNEXO-INRA n° 82/2678/4. La réalisation matérielle du manuscrit a été assurée par M^{me} D. Bouix.

Summary: *Development of a sensitive biological assay for measuring pituitary gonadotropic activities.*

The gonadotropic activity of a pituitary preparation may be very specifically estimated by a biological assay using induction of oocyte meiotic maturation in rainbow trout ovary incubated

in vitro (Jalabert *et al.*, 1974). However, this assay is not sensitive enough to measure such low activities as we found in sea bream pituitaries. We thus developed a biological assay based on the endocrine mechanism leading to meiotic maturation, i.e. the stimulation of the synthesis of the maturing sex steroid, 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesterone by gonadotropin *in vitro*. To augment the response observed, we amplified the signal of the first gonadotropic messenger (i.e. cyclic adenosine monophosphate: cAMP) by preventing its breakdown (by phosphodiesterase) using a chemical blocker (3-isobutyl-1-methylxanthine). This technique requires a method of assaying the maturing steroid. However, with a single sample several nanograms of gonadotropin can be measured in equivalent salmon GtH.

Resumen: *Puesta a punto de un test biológico sensible para medir las actividades gonadotropas hipofisarias.*

La estimación de la actividad gonadotropa de una preparación de origen hipofisario, se puede hacer de una manera muy específica, mediante la ayuda de un test biológico basado en la inducción de la maduración meiótica ovocitaria de los ovarios de la trucha arco iris incubados « *in vitro* » (Jalabert *et al.*, 1974). La sensibilidad de este test puede ser insuficiente en el caso de actividades débiles como las que hemos encontrado en hipófisis de dorada. Hemos desarrollado un test biológico basado en el mecanismo endócrino que conduce a la maduración meiótica, es decir a la estimulación que la gonadotropina produce de la síntesis « *in vitro* » del esteroide sexual madurador (17α -hidroxi- 20β -dihidroxiprogesterona). Para incrementar la respuesta observada, hemos amplificado la señal del primer mensajero de la gonadotropina (es decir el adenosin monofosfato ciclico, AMPc) impidiendo su degradación (por la fosfodiesterasa) mediante la ayuda de un bloqueador químico (la 3-isobutil-1-metilxantina).

Para aplicar esta técnica se necesita disponer de un método que permita determinar el esteroide madurador. De esta forma y a partir de una sola muestra se pueden estimar cantidades de gonadotropinas equivalentes a algunos nanogramos de GtH de salmón. Hemos aplicado esta técnica a la determinación de la actividad gonadotropa de las hipofisis de dorada.

Riassunto: *Messa a punto di un dosaggio biologico sensibile per la misura delle attività gonadotropiniche ipofisarie.*

È possibile effettuare la stima dell'attività gonadotropa di un preparato di origine ipofisaria, in maniera specifica, con l'aiuto di un dosaggio biologico che sfrutta l'induzione della maturazione meiotica ed ovocitaria, utilizzando l'ovario di trota iridea incubato *in vitro* (Jalabert *et al.*, 1974). Ora nel caso di attività gonadotropiche basse, come quelle che abbiamo riscontrate nelle ipofisi di orata, la sensibilità di questo dosaggio può rivelarsi insufficiente. Pertanto è stato da noi sviluppato un metodo di dosaggio biologico che riposa sul meccanismo endocrino che porta alla maturità meiotica, cioè alla stimolazione della sintesi steroidogenica per mezzo delle gonadotropine *in vitro* (17α -idrossi- 20β -diidroprogesterone).

Per aumentare la risposta osservata, si è amplificato il segnale del primo messaggero della gonadotropina (cioè l'adenosinmonofosfato ciclico, AMP) pescando la sua degradazione (attraverso la fosfodiesterasi) con l'aiuto di un bloccante chimico (la 3-isobutil-1-metilxantina).

Questa tecnica necessita di aver a disposizione un metodo di dosaggio dello steroide maturo. Quindi essa permette, a partire da un solo campione, di stimare quantità di gonadotropina di alcuni nanogrammi in equivalenti GtH di salmone. Il metodo è stato applicato per determinare le attività gonadotropiniche dell'ipofisi di orata.

Références bibliographiques

- BOGOMOLNAYA A., YARON Z., 1982. The nature of hypophyseal stimulation of estradiol secretion from fish ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **46**, 391-Abst. 130.
- BRETON B., JALABERT B., REINAUD P., 1976. Purification of gonadotropin from rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) pituitary glands. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **16**, 25-36.
- BRY C., 1981. Temporal aspects of macroscopic changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) oocytes before ovulation and of ova fertility during the post-ovulation period, effect of treatment with 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesterone. *Aquaculture*, **24**, 153-160.
- FONTAINE Y.-A., BURZAWA-GERARD E., DELERUE-LEBELLE E., 1970. Stimulation hormonale de l'activité adényl-cyclasique de l'ovaire d'un poisson téléostéen, le Cyprin, *Carassius auratus* L. *C.R. Acad. Sci.*, **271 D**, 780-783.
- 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 adényl cyclase activity in the goldfish ovary. *Can. J. Zool.*, **50**, 1673-1676.
- FOSTIER A., JALABERT B., CAMPBELL C., TERQUI M., BRETON B., 1981. Cinétique de libération *in vitro* de 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogestérone par des follicules de truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*. *C.R. Acad. Sci.*, **292 D**, 777-780.
- IDLER D. R., HWANG S. J., BAZAR L. S., 1975. Fish gonadotropin(s). I. Bioassay of salmon gonadotropin(s) *in vitro* with immature trout gonads. *Endocr. Res. Comm.*, **2**, 199-213.
- JALABERT B., 1976. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 974-988.
- JALABERT B., 1978. Production of fertilizable oocytes from follicles of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) following *in vitro* maturation and ovulation. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **18**, 461-470.
- JALABERT B., BRETON B., BILLARD R., 1974. Dosage biologique des hormones gonadotropes de poisson pour le test de maturation *in vitro* des ovocytes de truite. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **14**, 217-228.
- THORNTON V. F., 1971. A bioassay for progesterone and gonadotropins based on the meiotic division of *Xenopus laevis* *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **16**, 599-605.
- YARON Z., BOGOMOLNAYA A., 1983. Stimulation of estradiol secretion by the ovary of a teleost. Ninth International Symposium on Comparative Endocrinology Hong-Kong University Press (sous presse).