

20ème Journée d'Etude



2 Mars 1994

Les gonadotrophines équine : de la connaissance fondamentale à l'élevage

Equine gonadotrophins : from fundamental mean to breeding

(revue bibliographique)

Christine Gaillot*, D.
Guillaume* , F. Lecompte** et
Y. Combarous**

*Unité de reproduction équine, PRMD, INRA, 37380 Nouzilly, FRANCE

**Unité biochimie hormonale, testicules et spermatozoïdes, PRMD, CNRS URA 1291, INRA, 37380 Nouzilly, FRANCE

Résumé

Les gonadotrophines équine eFSH et eLH sont utilisées expérimentalement pour étudier la maîtrise du cycle sexuel de la jument.

Les études fondamentales menées sur la structure de ces hormones permettent de mieux comprendre leur mode d'action et d'appréhender leurs conditions d'utilisation.

Les premières études pharmaco-cinétiques nous apportent des données complémentaires quant à leur mode d'administration (voie d'injection, dose, rythme des injections).

Leurs applications sont essentiellement la superovulation, L'obtention de cycles féconds pendant l'inactivité hivernale et l'induction de l'ovulation.

Mots-clés: jument, eFSH, eLH, superovulation, induction d'ovulation.

Summary

Equine gonadotrophins, eFSH and eLH, are used in experimental trials to control the mare cyclicity.

The fundamental studies on the structure of this hormones are aimed to get a better understanding of their action and to improve their conditions of use .

The first kinetic studies draw out some complementary elements on their administration (route, dose, injection rhythm).

Their principal applications are superovulation, obtention of fertility cycles during winter inactivity and induction of ovulation.

Key-words: mare, eFSH, eLH, superovulation, induction of ovulation.

INTRODUCTION

Les gonadotrophines équines sont au nombre de trois : l'hormone folliculo-stimulante (eFSH), l'hormone lutéinisante (eLH), toutes deux d'origine hypophysaire, et l'hormone gonadotrope chorionique (eCG) précédemment dénommée "pregnant mare serum gonadotrophin" (PMSG) et produite par le placenta de la jument gestante.

Le présent article se limitera à l'étude, chez la jument, des deux hormones hypophysaires eFSH et eLH, dont les rôles principaux sont, pour FSH, de stimuler la croissance des follicules et la production d'estrogènes et pour LH, de déclencher l'ovulation et la formation du corps jaune.

En effet, bien que eCG puisse être utilisée à des fins de superovulation chez certaines femelles domestiques (bovins, petits ruminants), elle est inefficace chez la jument pour stimuler la croissance folliculaire ; l'étude de ce phénomène est particulièrement intéressante pour la compréhension des mécanismes responsables de la spécificité de liaison des gonadotrophines à leurs récepteurs. Le dosage de eCG peut être utilisé pour le diagnostic de gestation.

Enfin, l'administration à l'étalon d'hormones gonadotropes n'améliore pas la fonction de reproduction.

Les études fondamentales sur la structure des gonadotrophines participent à la compréhension de leur mode d'action, à la mise au point de leurs techniques de dosage et de leurs conditions d'utilisation.

Elles laissent également entrevoir à plus long terme d'autres applications, avec notamment les récents développements de la biologie moléculaire.

Les premières études pharmaco-cinétiques que nous avons réalisées sur ces hormones confirment les résultats obtenus au plan clinique.

Enfin, si leur utilisation pour le contrôle du cycle sexuel de la jument reste aujourd'hui limitée au domaine expérimental, leur emploi sur le terrain devrait pouvoir se concrétiser d'ici quelques années, tout au moins pour certaines applications bien maîtrisées.

ASPECTS FONDAMENTAUX : STRUCTURE ACTIVITE

Structure des gonadotrophines (Figure 1)

FSH et LH sont des glycoprotéines constituées de deux sous-unités différentes α et β dont les chaînes polypeptidiques sont associées de manière non covalente (Combarnous, 1992).

Les chaînes glycosidiques sont fixées sur des résidus asparagine des sous-unités α (Bahl et al, 1978) et β (Ward, 1990) et parfois sur des résidus sérine de la sous-unité β (hCG, eCG, eLH).

Dans une même espèce, la séquence de la portion polypeptidique de la sous-unité α est identique pour toutes les gonadotrophines :

Chez le cheval (*Equus caballus*) elle comporte 96 acides aminés (Combarnous, 1992), qui en constituent la structure primaire.

Figure I:

Structure des gonadotrophines équines

Structure of equine gonadotrophins

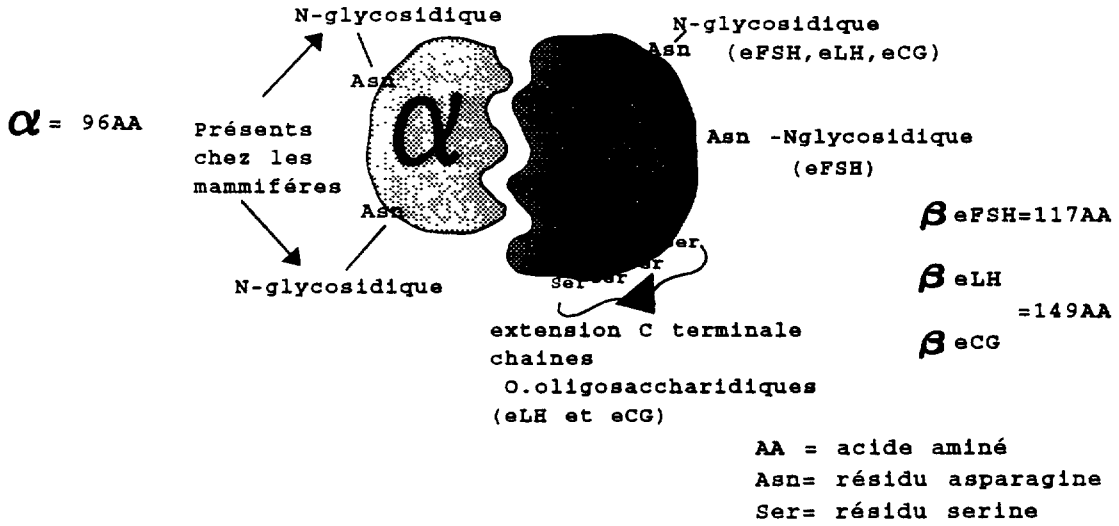
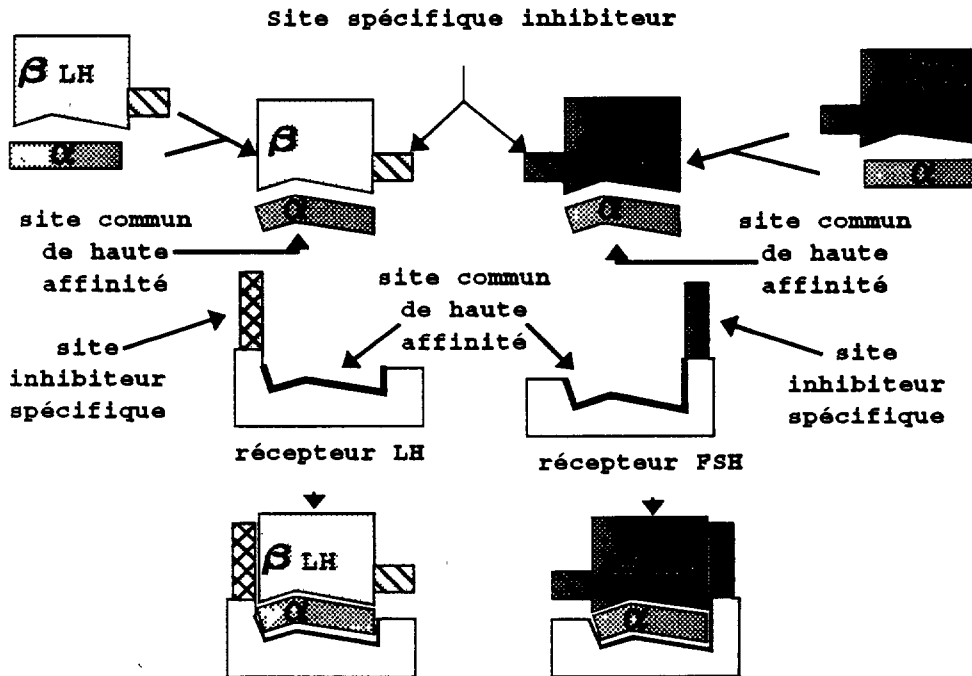


Figure II : Interaction des hormones glycoprotéiques avec leurs récepteurs

Interaction of glycoprotein hormones with their receptors



C'est la sous-unité β qui différencie les hormones glycoprotéiques dans une même espèce. Dans la plupart des espèces elle comporte au maximum 121 résidus d'acides aminés ; eFSH β en présente 117 ; par contre, pour eLH β et eCG β , 149 sont identifiés (Ward et al, 1990) ; cette extension qui porte des chaînes oligosaccharidiques sur des résidus sérine permet la détection immuno-spécifique de ces hormones (Combarrous, 1991).

Les structures protéiques de eCG et de eLH sont identiques, car elles sont les produits du même gène exprimé dans l'hypophyse et le placenta, mais leurs chaînes glycosidiques diffèrent.

L'organisation tridimensionnelle des chaînes polypeptidiques est stabilisée par la formation de ponts disulfure entre des résidus cystéine.

Relation structure activité

Les études fondamentales ont montré que l'activité des gonadotrophines était déterminée d'une part par l'association des deux sous-unités α et β , d'autre part par la fixation des hormones à leurs récepteurs puis l'activation des cellules cibles des ovaires productrices de stéroïdes (Combarrous, 1991)(Combarrous et al, sous presse).

La dissociation des sous-unités α et β peut être obtenue par une variation de pH, une élévation de température, la mise en présence d'urée ou de guanidine (Combarrous, 1991) ; ces éléments devant être pris en compte lors de la préparation ou de l'utilisation des hormones.

Dans les conditions physiologiques, un équilibre s'installe entre les formes associées et dissociées ; ainsi, *in vivo*, du fait de leur faible vitesse de dissociation et bien que les concentrations en hormones circulantes soit minimales, leur structure tridimensionnelle active reste conservée au moins jusqu'à leur inactivation et leur élimination (Combarrous et al, sous presse).

De récents travaux nous permettent d'approcher l'identification des sites moléculaires impliqués dans la liaison aux récepteurs (Combarrous et al, sous presse).

Les hormones équine constituent à ce titre un modèle particulièrement intéressant : si eFSH présente exclusivement une activité FSH homologue (chez le cheval), eLH et eCG présentent une double activité LH/FSH hétérologue (dans les autres espèces, y compris l'âne !).

Parmi les technologies utilisées il est intéressant de mentionner :

- les anticorps monoclonaux anti α ou anti β ou la sous unité impliquée dans la liaison aux récepteurs est protégée des anticorps,
- les peptides synthétiques qui reproduisent une séquence donnée de l'une ou l'autre des chaînes polypeptidiques et qui inhibent la fixation de l'hormone à ses récepteurs si la séquence est impliquée dans la liaison,
- la mutagenèse dirigée qui consiste à substituer sélectivement sur une hormone native un ou plusieurs acides aminés afin d'observer les conséquences sur son activité,
- la fabrication d'hormones hybrides par recombinaison de deux sous-unités d'espèces différentes, afin de déterminer le rôle de chaque sous-unité.

Sur la base de ces résultats, nous proposons un modèle (Combarrous, 1991) où la portion polypeptidique conditionne la liaison aux récepteurs (figure II).

La sous-unité α est responsable de la haute affinité de la liaison des hormones à leurs récepteurs, en acquérant sa conformation tridimensionnelle active lorsqu'elle est liée à β .

La sous-unité β conditionne la spécificité de liaison d'une hormone donnée à ses récepteurs en empêchant sa fixation sur les récepteurs des autres hormones.

La stimulation des cellules cibles nécessite l'interaction de la portion polysaccharidique de l'hormone avec des constituants de la membrane plasmique.

La double activité hétérologue LH/FSH de eLH et de eCG s'explique par la possibilité de fixation de ces hormones sur des récepteurs LH et FSH hétérologues et l'activation des cellules cibles correspondantes.

En système homologue équin, l'inhibition spécifique s'effectue à l'égard de eCG et de eLH, sur les récepteurs de eFSH ; bien que eCG puisse se fixer sur les récepteurs eLH elle n'exerce qu'une faible stimulation cellulaire (5% par rapport à eLH) ; ceci permet d'expliquer la totale inactivité de ces hormones dans l'espèce équine.

CONDITIONS D'UTILISATION

Caractéristiques des gonadotrophines utilisées

Leur fabrication s'effectue selon deux étapes :

- une première extraction par un mélange d'alcool et d'acétate d'ammonium à partir d'hypophyses congelées (Lapin et al, 1977) permet d'obtenir un extrait, le CEG (crude equine gonadotrophin), qui contient environ 3% de FSH et 6% de LH.
- le fractionnement du CEG par chromatographie d'interaction hydrophobe aboutit à l'obtention de deux fractions dont l'une est enrichie en FSH (12% de FSH et 3% de LH), et l'autre en LH (25% de LH pour seulement 1,5% de FSH) (Hofferer et al, 1992) (Hofferer et al, 1993).

Leur administration est réalisée :

- soit par injection intra-musculaire de la fraction enrichie en FSH, plusieurs jours de suite, lorsque l'on recherche un effet FSH pour la superovulation.
- soit par une injection intra-veineuse unique de CEG lorsque l'on souhaite produire un taux élevé de LH plasmatique induisant l'ovulation.

Etude pharmacocinétique de la eFSH.

Elle constitue un préalable indispensable à l'optimisation de la posologie de cette hormone.

Trois ponettes Welsh (poids moyen S.E.M. : 196 ± 38 kg) ont subi successivement 3 types de traitements différents. Avant chaque traitement, afin d'abaisser la production d'hormone endogène, chaque ponette a reçu durant la phase progestative de son cycle une éponge vaginale imprégnée de 500 mg d'ALTRENOGEST (Roussel Uclaf) et de 50 mg de β ESTRADIOL 3

BENZOATE (Sigma) (Palmer et al, 1982). Cette éponge a été maintenue en place pendant 10 jours.

Trois jours après la pose de l'éponge, le CEG a été injecté :

- soit en intra-veineuse (i.v.), 1 dose de 25mg (environ 0.75 mg de eFSH) dans la veine jugulaire droite,
- soit en intramusculaire (I.M.), soit en sous-cutanée (S.C.), 4 doses (de façon à obtenir des concentrations mesurables) de 25mg injectées séparément dans l'encolure à droite, à environ 5 cm de distance .

Les prélèvements de sang ont été effectués dans la veine jugulaire droite aux temps suivants : -60 mn ; -30 mn ; -20 mn ; -10 mn ; -5 s ; 1 mn ; 2 mn ; 4 mn ; 6 mn ; 8 mn ; 10 mn ; 12 mn ; 15 mn ; 20 mn ; 25 mn ; 30 mn ; 35 mn ; 40 mn ; 45 mn ; 60 mn ; 75 mn ; 90 mn ; 2 h ; 2.5 h ; 3 h ; 3.5 h ; 4 h ; 5 h ; 6 h ; 8 h ; puis toutes les 8 heures pendant 96 h. Le sang a été immédiatement centrifugé à température ambiante pendant 5 mn. Le plasma a été congelé à -20 C. Dans ces échantillons, la eFSH a été dosée par radio-immunologie en utilisant un anticorps anti-eFSH et de la eFSH marquée à l'iode 125. Les concentrations ont été calculées par une régression de type logistique 4 paramètres comparativement à une gamme de eFSH s'étendant de 0.5 à 500 ng/ml.

Pour chaque traitement, le niveau de base de l'hormone a été retranché, la concentration ainsi obtenue a été standardisée par rapport aux poids de l'animal puis divisée par 4 pour les I.M. et S.C. Les données supérieures au niveau de base ont été traitées dans un modèle tricompartmental pour les I.V. et bicompartimental avec absorption pour les I.M. et les S.C..

Les résultats sont présentés pour un animal caractéristique (figure III) :

- les taux obtenus après injection I.V. sont immédiatement très élevés, mais décroissent aussi très vite ; la demi-vie d'élimination calculée après I.V. est d'environ 7.5 h ce qui est du même ordre de grandeur que celle obtenue par Irvine en 79 (environ 5 h, mais calculée dans un autre type de modèle) (Irvine, 1979)
- les biodisponibilités après I.M. ou S.C. sont voisines et extrêmement faibles, ce qui est probablement dû à une protéolyse partielle locale.

Si l'injection IV paraît bien adaptée pour induire un taux plasmatique élevé et de courte durée, L'injection SC ou IM permet d'obtenir un taux plasmatique très faible mais de longue durée et s'adresse donc plutôt au traitement de "superovulation".

RESULTATS, APPLICATIONS

L'emploi des gonadotrophines reste aujourd'hui encore limité au domaine expérimental, soit parce que la technologie n'est pas encore maîtrisée, c'est le cas de la superovulation ; soit parce que la commercialisation du produit nécessite l'obtention préalable d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), c'est le cas du CEG utilisé pour l'induction de l'ovulation.

Pour les trois principaux domaines de recherche présentés ci-dessous, il est donc vraisemblable que le transfert à l'élevage se fera suivant des échéances différentes.

L'induction de l'ovulation

Mise au point en 1987 (tableau 1) (Duchamp et al,1987), elle fournit une alternative à l'utilisation de hCG (hormone chorionique humaine), qui entraîne la formation d'anticorps lors d'injections répétées.

Une injection intra-veineuse unique d'une dose de 25mg de CEG quand le follicule préovulatoire atteint 35 mm induit l'ovulation en 24 à 48 heures. Il n'y a pas formation d'anticorps, et la fertilité des juments est conservée.

Depuis 1987, cette technique est employée systématiquement sur le troupeau expérimental de Nouzilly ; elle apparaît fiable et répétable.

Une demande d'autorisation de mise sur le marché est donc envisagée.

La superovulation

Elle est actuellement maîtrisée chez les bovins et les petits ruminants, pour lesquels une préparation commerciale d'extraits hypophysaires est disponible depuis 1992 : chez la vache, on obtient une moyenne de 20 ovulations et 5 embryons par cycle (Chemineau et al, 1991) ; cette espèce présentant l'avantage par rapport aux petits ruminants d'être collectée par voie cervicale, ce qui autorise la répétition de l'intervention.

Chez la jument, également collectée par voie cervicale, le traitement de superovulation augmente de façon significative le nombre d'ovulations par cycle (2 à 3 en moyenne, contre 1 pour les cycles témoins) ; il ne permet cependant pas d'améliorer le taux de collecte des embryons (0,6 embryon par cycle témoin ou traité).

Ces résultats décevants seraient attribuables, au moins en partie, à une différence de qualité des ovocytes générés par le traitement (Goudet et al, sous presse).

L'obtention de cycles féconds pendant l'inactivité hivernale

Cette expérience décrite en 1977 (Lapin et al, 1977) a été renouvelée en comparant les extraits hypophysaires bruts et la fraction purifiée en FSH pendant deux périodes, été et hiver (tableau 2)(Palmer et al,1992).

Avec les deux types de produits, le traitement de stimulation appliqué pendant 2 cycles et couplé à un traitement d'induction de l'ovulation, a permis la croissance et l'ovulation de follicules qui auraient normalement régressé, ainsi que l'obtention d'embryons à raison de 0,6 embryon en moyenne par cycle.

A l'arrêt du traitement, les juments sont toutes retournées en anoestrus.

Ces résultats pourraient trouver des applications en élevage, notamment pour l'induction de cycles en début de saison de monte.

Tableau 1

Induction de l'ovulation par injection d'extraits hypophysaires (CEG), comparée à d'autres systèmes d'induction.

Induction of ovulation with injection of pituitary extracts (CEG), compared with other systems of induction.

	hCG 2500ui	hCG à juments immunisées contra hCG	GnRH 2mg im	LH porcine 26mg iv ou sc	CEG 25mg iv
% de juments	73% n=154	0% n=10	40% n=30	31% n=16	86% n=29

Tableau 2

Comparaison des réponses ovariennes et embryonnaires aux traitements de superovulation selon la saison. Comparison of ovarian and embryonic responses to superovulation treatments depending on the season

	nb de follicules >30 nb of follicles >30	nb d'ovulations nb of ovulations	nb d'embryons nb of embryos
témoins/control	1.00±0.00 n=28 **	1.00±0.00 n=28 **	0.54±0.09 n=28 ns
traités/treated	3.02±0.23 n=60	2.85±0.25 n=59	0.58±0.09 n=57
Parmi les cycles traités/among treated			
hiver/winter	3.27±0.29 n=30 ns	3.31±0.33 n=29 ns	0.64±0.14 n=28 ns
été/summer	2.77±0.35 n=30	2.40±0.35 n=30	0.52±0.09 n=29
1e stimulation/ 1st stimulation	2.97±0.32 n=30 ns	2.55±0.33 n=29 ns	0.55±0.13 n=29 ns
2e stimulation/ 2nd stimulation	3.07±0.34 n=30	3.13±0.36 n=30	0.61±1.12 n=28

CONCLUSION

Les études fondamentales menées sur les gonadotrophines eFSH et eLH permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces hormones chez le cheval, mais également chez les autres espèces domestiques.

Elles laissent aussi entrevoir la possibilité d'obtenir, à l'instar de la recherche humaine, mais dans un avenir plus lointain, des hormones recombinantes équine qui présentent, par rapport aux extraits hypophysaires, des avantages évidents, notamment pureté, reproductibilité des conditions de fabrication, contrôle de la matière première.

Les applications potentielles actuelles des gonadotrophines équine sont connues mais devront, avant de pouvoir être proposées aux éleveurs, franchir plusieurs étapes obligatoires dont on ignore actuellement le terme.

Quoi qu'il en soit, la perspective d'utilisation de nos extraits hypophysaires pour induire l'ovulation chez la jument ne doit pas être négligée, puisqu'elle est aujourd'hui bien maîtrisée.

Références bibliographiques

Bahl OP, Moyle WR, 1978, Role of carbohydrate in the action of gonadotropins, *Receptors Horm. Action*, 3, 26 1-289 .

Chemineau Ph, Chupin D, Cognié Y, Thimonier J, 1991, La maîtrise de la fertilité des mammifères domestiques, In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Thibault C et Levasseur MC, INRA, Ellipses, Edition Marketing, Paris, 555 - 676.

Combarrous Y, 1991, Les gonadotropines : structure - synthèse - fonctions, In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Thibault C et Levasseur MC, INRA, Ellipses, Edition marketing, Paris, 53 -69.

Combarrous Y, 1992, Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors, *Endocrine Reviews*, 13 (4), 670-691.

Combarrous Y, Apparailly F, Lecompte F, Chopineau M, Fontaine I, Guillou F, Lagarde D, Laurent-Cadoret L, Magallon T, Martinat N, Maurel MC, Royère D and Suire S, Binding specificity and stimulation efficiency of gonadotropins, (sous presse)

Duchamp G, Bour B, Combarrous Y et Palmer E, 1987, Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare, *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35,221-228.

Goudet G, Bezar J, Duchamp G, Gaillot Ch, Bruneau B et Palmer E, Qualité des ovocytes et des follicules après superovulation ou au cours de cycles naturels, 20ème journée de la recherche chevaline, CEREOPA.

Hofferer S, Lecompte F, Magallon T, Palmer E, Combarnous Y, 1992, Gonadotropines équine : purifications, spécificités, dosages immunologiques et utilisation chez la jument, *Ann. Zootech.*, 41, 279-286.

Hofferer S, Lecompte F, Magallon T, Palmer E, Combarnous Y, 1993, Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography, *J. Reprod. Fert.*, 98, 597 - 602.

Irvine CHG, 1979, Kinetics of gonadotrophins in the mare, *J. Reprod. Fert.*, Suppl.27, 131-141.

Kessler MJ, Mise T, Ghai RD, Bahl OP, 1979, Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin, *J. Biol. Chem.*, 254, 7909-7914.

Lapin DR and Ginther OJ, 1977, Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory mares with an equine pituitary extract, *J. Anim. Sci.*, 44, 834 - 842.

Palmer E et Driancourt MA, 1982, Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronisation treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges, *J. Reprod. Fert.*, 32, 283-291 .

Palmer E., Hajmeli G., (1992), Essais de superovulation chez la jument, *Rec. Med. Vet.*, 168, 11/12, 897-905.

Ward DN, Bousfield GR, Mar AO, 1990, Chemical reduction-reoxidation of the glycoprotein hormones disulfide bonds, In : Bellet D, Bidart JM, (eds), *Structure-Function Relationships of Gonadotropins*, Serono Symposium Publication, Raven Press, New York, vol 65, 1-19.