

DOSAGE BIOLOGIQUE DES HORMONES GONADOTROPES DE POISSONS PAR LE TEST DE MATURATION *IN VITRO* DES OVOCYTES DE TRUITE

B. JALABERT, B. BRETON et R. BILLARD
avec la collaboration technique de Marie-Claire THERON,
Anne-Marie ESCAFFRE et Pierrette REINAUD

*Laboratoire de Physiologie des Poissons,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

Le phénomène de maturation *in vitro* des ovocytes de Truite a été utilisé pour mettre au point une méthode de dosage biologique de l'hormone gonadotrope hypophysaire. Chaque extrait à doser a subi une série de dilutions dont l'effet a été testé sur des lots de 25 ovocytes au stade de la vésicule germinale périphérique incubés 4 jours à 10 °C. La dose théorique provoquant 50 p. 100 de maturation (DE_{50}) a été déterminée avec précision pour chaque extrait. Les DE_{50} relatives à différents extraits ou hormones ont pu être comparées directement; ainsi *c-G/H* (hormone gonadotrope de Carpe) et SG-G₁₀₀ (extrait gonadotrope de Saumon) se sont révélés environ 1 000 fois plus efficaces que *o-LH*.

Malgré la variabilité de sensibilité observée pour un même extrait entre les ovocytes de femelles différentes, la conservation des rapports d'efficacité entre couples d'extraits identiques permet de comparer toutes les séries de dosages, par référence à l'efficacité d'une préparation gonadotrope standard testée sur les ovocytes de chaque femelle. La sensibilité du dosage est suffisante pour déterminer l'activité gonadotrope de l'hypophyse d'une truitelle immature. Elle peut être doublée par l'adjonction d'hydrocortisone (0,5 µg/ml) au milieu d'incubation.

Dans l'ensemble la méthode de dosage biologique proposée apparaît sensible et précise, spécifique et représentative de l'activité gonadotrope des Salmonidés, applicable aussi au dosage de l'hormone gonadotrope de Carpe et éventuellement d'autres poissons. Elle ne peut cependant être employée directement pour le dosage plasmatique et son utilisation paraît devoir être limitée au dosage d'extraits hypophysaires.

INTRODUCTION

Nous avons récemment discuté la notion de spécificité zoologique des hormones gonadotropes de Poissons à la lumière d'un certain nombre d'observations sur leur activité biologique et leurs relations immunologiques (BRETON, BILLARD, JALABERT,

1973) et nous avons critiqué tout particulièrement les modes d'appréciation d'une activité gonadotrope des hypophyses de Poissons faisant appel à des réponses biologiques sur d'autres vertébrés que les Poissons. Les exigences fondamentales formulées quant au choix d'un critère de dosage biologique peuvent en fait s'énumérer ainsi :

1. spécificité zoologique aussi étroite que possible ;
2. absence d'interférences entre l'extrait gonadotrope exogène à doser et l'activité gonadotrope endogène de l'animal receveur ;
3. représentativité et spécificité du test par rapport à une activité gonadotrope ;
4. sensibilité et précision ;
5. simplicité de mise en œuvre.

Or nous avons par ailleurs mis en évidence la possibilité de provoquer *in vitro* la maturation des ovocytes de Truite prélevés au stade de la vésicule germinale périphérique, sous l'action d'hormones gonadotropes qui serait vraisemblablement relayée par des hormones stéroïdes produites dans l'ovaire même (JALABERT, BRETON, BRY, 1972 ; JALABERT *et al.*, 1973 ; FOSTIER, JALABERT, TERQUI, 1973). Ce phénomène de maturation s'accompagne de modifications de structure tellement apparentes qu'elles permettent de distinguer sous loupe, et même à l'œil nu, les ovocytes maturés des témoins. La simplicité de quantification de cette réponse nous a conduits à essayer de définir les modalités d'application permettant de disposer, chez les Poissons, d'un dosage biologique des hormones gonadotropes de Poissons comparable à celui mis au point par THORNTON (1971) chez les Amphibiens.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les femelles de Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) qui nous ont fourni les ovocytes au stade convenable dit de la « vésicule germinale périphérique » (JALABERT, BRETON, BRY, 1972) ont été sacrifiées pendant la période de reproduction naturelle (novembre à janvier) immédiatement avant chaque essai. Nous avons choisi des animaux de grande taille, susceptibles de nous fournir de 2 000 à 7 000 ovocytes au même stade.

Les ovaires ont été découpés en petits fragments et ceux-ci répartis pour former des lots de 25 ovocytes dans des coupelles de verre, contenant 2 ml du milieu d'incubation antérieurement défini (JALABERT *et al.*, 1973).

Les préparations hypophysaires suivantes de Truite ont été utilisées :

Extrait brut d'hypophyses fraîches ou EH_f, préparé par broyage des hypophyses fraîches au potter, dans du milieu d'incubation à raison de 5 mg de poids frais pour 1 ml, congélation, décongélation, centrifugation et élimination du culot.

Poudre hypophysaire acétonique de Truite ou PH_a : les hypophyses fraîches de Truites de 2 ans sont congelées dans l'azote liquide immédiatement après sacrifice, broyées dans l'acétone à — 20°C, puis laissées sous agitation à froid pendant 12 h. Après filtration sur buchner, le broyat est lavé 2 fois au N-butanol et 1 fois à l'éther, puis séché, donnant la PH_a. A partir de cette poudre, peut être préparé un extrait brut hypophysaire (EH_a) par agitation d'une suspension de PH_a (1 mg/ml de milieu d'incubation) à 4°C pendant 12 h, centrifugation et élimination du culot. Le contenu gonadotrope de 1 ml de cette solution brute est supposé équivalent, en première approximation, à celui de 1 mg de PH_a (l'extraction étant supposée complète).

Extrait glycoprotéique hypophysaire ou EPH, préparé par la méthode suivante : la poudre acétonique PH_a est soumise à extraction dans une solution d'éthanol à 40 p. 100 et de NaCl à 2 p. 100 pendant 24 h à 4°C (5 g de PH_a pour 200 ml de solution), puis centrifugée à 3 500 t/mn pendant 20 minutes ; le culot est repris 3 fois dans les mêmes conditions. Les surnageants sont réunis et ajustés à pH 5,2 par de l'acide acétique glacial à froid. La solution est amenée à une concentration de 85 p. 100 en éthanol par addition d'éthanol absolu, ce qui provoque la précipitation, entre autres, des glycoprotéines. Après centrifugation, le précipité est repris par l'acétone froid et séché.

La préparation gonadotrope de Saumon partiellement purifiée, SG-G₁₀₀, nous a été fournie par E. M. DONALDSON, Fisheries Research Board of Canada (DONALDSON *et al.*, 1972).

L'hormone gonadotrope de Carpe (*c-GtH* ou *c-HG*) a été préparée par E. BURZAWA-GERARD (1971).

Les hormones *o-LH* et *o-FSH* nous ont été fournies par le Laboratoire des hormones polypeptidiques du C. N. R. S. (Dr. JUTISZ), 91190 Gif sur Yvette.

Afin de comparer l'activité biologique des différents extraits hypophysaires et hormones, chacun a subi à partir d'une concentration initiale C, une série de dilutions en décroissance géométrique telle que C, $\frac{1}{2}$ C, $\frac{1}{4}$ C, etc. ou C, $\frac{2}{3}$ C, $(\frac{2}{3})^2$ C, $(\frac{2}{3})^3$ C, etc.

Pour chaque gamme ainsi réalisée, un volume de 50 μ l de chaque dilution a été rajoutée à une coupelle test contenant 25 ovocytes dans 2 ml, soit une nouvelle dilution de 1/20. Dans tous les tableaux et graphiques seront mentionnées les concentrations finales en μ g/ml de milieu d'incubation.

Le critère de maturation retenu, pour des raisons de rapidité d'identification et de comptage sur de grandes séries d'ovocytes, est le phénomène net de clarification du vitellus avec apparition de gouttelettes lipidiques corticales appelé maturation vitelline, qui a déjà été décrit par ailleurs (JALABERT *et al.*, 1973).

Traitement des données

Après incubation, le nombre d'ovocytes ayant subi la maturation a été déterminé pour chaque coupelle. La représentation graphique du pourcentage de maturations en fonction du logarithme de la dose pour un extrait donné est une courbe sigmoïde qui se prête mal à une exploitation statistique. C'est pourquoi les pourcentages ont été convertis en probits, la représentation graphique des probits en fonction du log. de la dose étant alors de type linéaire. Le calcul de la droite de régression correspondante a été effectué par la méthode du maximum de vraisemblance, ou méthode des probits de travail (FINNEY, 1962) qui permet d'évaluer la dose théorique correspondant à 50 p. 100 de maturation (DE₅₀, ou dose efficace à 50 p. 100) et sa précision (exemple fig. 1). Chaque extrait est ainsi caractérisé par une droite de régression et une DE₅₀ affectée

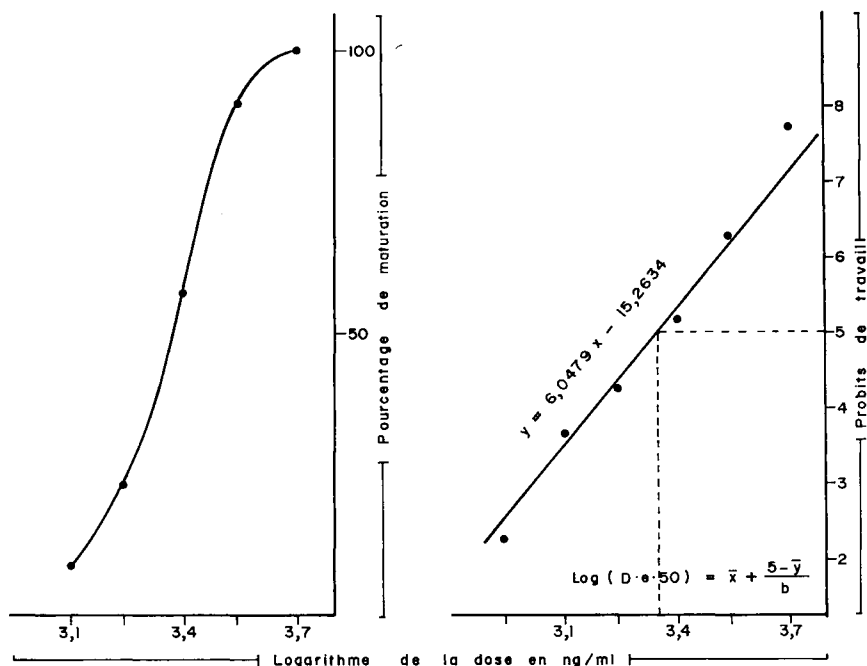


FIG. 1. — Transformation de la courbe représentant le pourcentage de maturations en fonction du logarithme de la dose (extrait de protéines hypophysaires de Truite, EPH), en une droite de régression permettant le calcul précis de la DE₅₀ et de son intervalle de confiance.

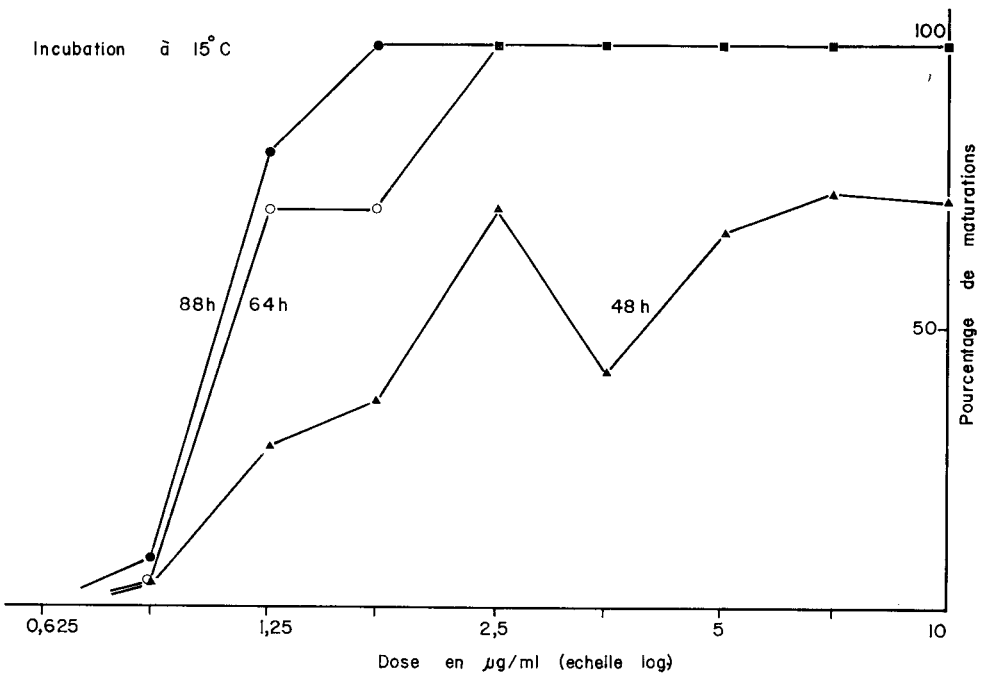
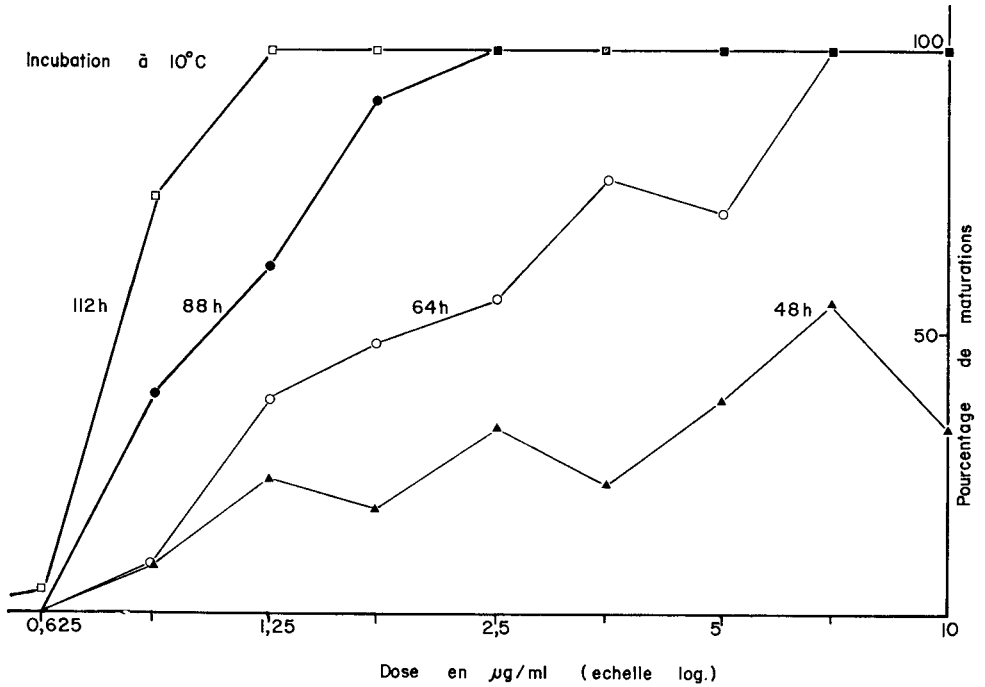


FIG. 2. — Évolution de la courbe de maturation (pourcentage de maturations en fonction du log. de la dose du même extrait hypophysaire de Truite, EPH) en fonction du temps d'incubation. Températures d'incubation : fig. 2 a, 10°C ; fig. 2 b, 15°C.

de son intervalle de confiance pour $p = 95$ p. 100. Le parallélisme des droites de régression obtenues chez une même femelle avec des extraits différents a ensuite été testé afin de calculer la puissance relative de ces extraits.

RÉSULTATS

Choix de la température et de la durée d'incubation

La courbe qui représente le pourcentage de maturation en fonction de la dose pour un extrait donné, se déplace en fonction de la durée d'incubation, à température d'incubation constante (fig. 2 a et 2 b). L'évolution est plus rapide à 15°C. Au-delà de 88 à 100 h à 15°C et de 110 à 125 à 10°C, les ovocytes n'ayant pas commencé leur maturation commencent à dégénérer, ce qui bloque l'évolution de la courbe.

Les essais menés à 20°C ont montré un démarrage rapide de la maturation en 48 h, suivi de la dégénérescence des ovocytes maturants ou non, ce qui interdisait tout comptage significatif.

La meilleure sensibilité étant obtenue à 10°C, nous avons retenu pour cette température une durée d'incubation de 90 à 112 h, soit 4 jours \pm 5 h, le comptage étant effectué au cours de la 4^e journée d'incubation.

Comparaison des courbes de réponse à plusieurs traitements chez les ovocytes d'une même femelle

La figure 3 donne la courbe du pourcentage de maturation en fonction de la dose pour plusieurs extraits et hormones hypophysaires gonadotropes. A partir de ces données et après conversion des pourcentages de maturation en valeurs probits,

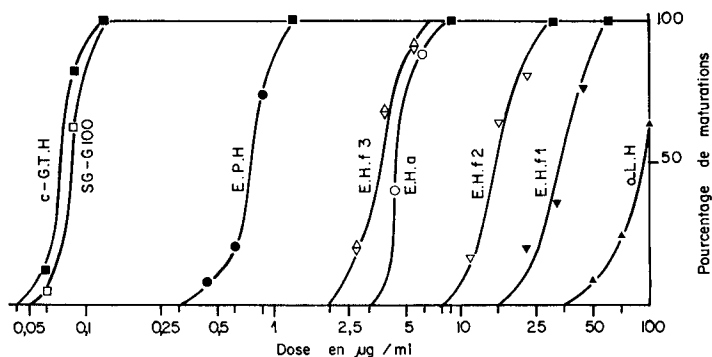


FIG. 3. — Courbes de maturation obtenues pour différents extraits et hormones gonadotropes hypophysaires sur les ovocytes d'une même femelle

- c-GtH : Hormone gonadotrope de Carpe
- o-LH : Hormone lutéinisante ovine
- SG-G₁₀₀ : Extrait gonadotrope de Saumon (E. M. DONALDSON)
- EPH : Extrait de protéines hypophysaires de Truite
- EH_a : Extrait brut d'une poudre hypophysaire acétonique de Truite
- EH_f : Extraits bruts d'hypophysés fraîches (en μ g d'hypophyse fraîche/ml)
- EH_{f₁} : Extrait de l'hypophyse d'une truitelle femelle de 2 ans immature
- EH_{f₂} : Extrait de l'hypophyse d'un géniteur femelle de 3 ans, avant la fraie
- EH_{f₃} : Extrait de l'hypophyse d'un géniteur femelle de 3 ans, 15 jours après la fraie

la DE_{50} de chaque traitement a été calculée (tabl. 1) et affectée de son intervalle de confiance au seuil $P = 95$ p. 100. L'hormone gonadotrope de Carpe (*c-GtH*) montre une DE_{50} de l'ordre de $0,067 \mu\text{g/ml}$, ce qui correspond à une sensibilité très satisfaisante alors que la *o-LH*, hormone gonadotrope de Mammifères, bien qu'active, présente une DE_{50} de $85 \mu\text{g/ml}$.

TABLEAU I

Comparaison entre les DE_{50} obtenues sur les ovocytes d'une même femelle avec différents extraits ou hormones gonadotropes,

EH_{f_1} : Extrait de l'hypophyse fraîche d'une Truite femelle de 2 ans immature ;
 EH_{f_2} : — — — d'un géniteur femelle de 3 ans avant la fraie ;
 EH_{f_3} : — — — — — de 3 ans, 15 j. après la fraie.

Extrait ou hormone	DE_{50} (en $\mu\text{g/ml}$)	
	Moyenne	Intervalle de confiance au seuil ($p = 95$ p. 100)
<i>c-GtH</i>	0,067	0,060-0,074
<i>o-LH</i>	85	77-95
SG-G ₁₀₀	0,083	0,073-0,095
EPH	0,72	0,65-0,80
EH_a	4,7	4,2-5,2
EH_{f_1}	35	32-38
EH_{f_2}	14	12,7-15,7
EH_{f_3}	3,5	3,2-3,9

L'extrait de Saumon SG-G₁₀₀, le plus purifié des extraits de Salmonidés testés, donne une DE_{50} de $0,083 \mu\text{g/ml}$, supérieure à celle de *c-GtH* à la limite de la signification.

Le parallélisme des droites de régression probits/log. (dose) permet de comparer directement l'efficacité des différents extraits testés sur une même femelle en faisant le rapport des DE_{50} .

Les valeurs de DE_{50} relatives aux extraits d'hypophysés fraîches démontrent la possibilité de doser la teneur en hormone gonadotrope d'une seule hypophyse, même s'il s'agit de l'hypophyse d'une truitelle immature.

*Comparaison des dosages réalisés à partir de lots d'ovocytes
provenant de femelles différentes*

Le tableau 2 représente les DE_{50} obtenues dans 3 dosages différents sur les ovocytes de 3 femelles différentes pour les extraits suivants : SG-G₁₀₀, EH_a (extrait de poudre acétonique hypophysaire de Truite) et EPH. D'un dosage à l'autre on constate que la DE_{50} d'un extrait donné varie significativement. Par contre, les rapports d'efficacité entre différents extraits ne varient pas significativement d'un dosage

à l'autre. Ceci autorise donc à comparer l'efficacité de différents extraits pour tous les dosages à condition de l'exprimer par rapport à un extrait standard unique (Ici, par exemple, l'extrait EPH testé dans les 3 dosages, peut servir de standard de référence).

TABLEAU 2

Comparaison entre les DE_{50} (en $\mu\text{g/ml}$) de trois extraits, obtenus dans des dosages sur les ovocytes de femelles différentes (1, 2, 3), montrant la conservation des rapports d'activité entre extraits considérés 2 à 2, d'un dosage à l'autre. Toutes les valeurs sont affectées de leur intervalle de confiance au seuil $P = 95$ p. 100.

Dosage numéro	SG-G ₁₀₀	EPH	EH _a	$\frac{EH_a}{EPH}$	$\frac{EPH}{SG-G_{100}}$
1		2,24 (1,99-2,53)	17,6 (15,6-20,0)	7,9 (6,6-9,4)	
2	0,196 (0,174-0,220)	1,63 (1,50-1,72)			8,3 (7,2-9,6)
3	0,083 (0,073-0,095)	0,72 (0,65-0,80)	4,7 (4,2-5,2)	6,5 (5,6-7,5)	8,7 (7,5-10,1)

Amélioration de la sensibilité des dosages par adjonction d'hydrocortisone dans le milieu d'incubation

Le tableau 3 montre les différentes DE_{50} observées pour un même extrait EPH sur une même femelle, si l'on ajoute au milieu du cholestérol (0,5 $\mu\text{g/ml}$), de l'hydrocortisone (0,5 $\mu\text{g/ml}$) ou seulement le solvant de ces stéroïdes (5 μl d'éthanol pour

TABLEAU 3

Modifications de la DE_{50} observées pour un même extrait (EPH) sur les ovocytes d'une même femelle en fonction de l'adjonction au milieu d'incubation, d'hydrocortisone, de cholestérol ou du solvant seul de ces stéroïdes (éthanol 5 $\mu\text{l/ml}$).

Traitement	DE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Intervalle de confiance ($p = 95$ p. 100)
EPH seul	1,22	1,09-1,38
EPH + hydrocortisone (0,5 μg dans 0,5 μl d'éthanol/ml)	0,74	0,65-0,84
EPH + cholestérol (0,5 μg dans 5 μl d'éthanol/ml)	2,14	1,91-2,39
EPH + éthanol (5 $\mu\text{l/ml}$)	2,58	2,37-2,82

2 ml). La présence d'hydrocortisone abaisse très significativement la DE_{50} de l'extrait par rapport au témoin et augmente donc la sensibilité du dosage. Par contre l'effet du cholestérol est semblable à celui du solvant seul qui est légèrement défavorable.

DISCUSSION

Le système de dosage proposé, qui s'apparente dans son principe aux tests mis au point par THORNTON (1971) chez *Xenopus* et proposés par GONTCHAROV (1971) chez la Grenouille et l'Esturgeon, présente de nombreux avantages :

Du point de vue de la spécificité zoologique, ce test est théoriquement idéal pour doser l'hormone gonadotrope des Salmonidés dans la mesure où il est représentatif d'un effet gonadotrope typique. Mais, du fait de la variabilité de la DE_{50} observée pour un même extrait gonadotrope d'un animal à l'autre, il serait intéressant, pour pouvoir comparer des séries de dosages effectuées sur les ovocytes de femelles différentes, d'exprimer l'efficacité de toutes les préparations dosées par rapport à une préparation invariante pour laquelle la réponse servirait de standard de référence, pour chaque groupe d'ovocytes provenant d'une même femelle. Ce mode d'expression est justifié du fait de la conservation des rapports d'efficacité entre préparations identiques, d'un dosage à l'autre. Or l'hormone gonadotrope de Carpe *c-GtH* qui est jusqu'à présent la seule hormone purifiée de Poisson en notre possession, est très efficace dans notre test ; cependant, du fait de l'existence prévisible d'une spécificité zoologique entre les hormones gonadotropes de Carpe et de Salmonidés, déjà démontrée par FONTAINE *et al.* (1972) en ce qui concerne l'action stimulante sur l'adényl-cyclase de l'ovaire de Poisson rouge, il est probable que l'efficacité de *c-GtH* sur la maturation des ovocytes de Truite est inférieure à celle de l'hormone gonadotrope de Truite. Cette perte d'efficacité due à la spécificité zoologique de la molécule d'hormone ne pourra être évaluée que lorsqu'une hormone de Salmonidé, aussi purifiée que *c-GtH* sera disponible. C'est pourquoi nous ne pouvons utiliser pour le moment la *c-GtH* comme un standard de référence absolu. La très faible sensibilité observée avec l'hormone mammalienne *o-LH*, conforme aux observations biologiques et immunologiques déjà réalisées (BRETON, BILLARD, JALABERT, 1973) interdit évidemment a fortiori son utilisation comme standard. En effet, l'efficacité de *c-GtH* ou SG-G₁₀₀ est plus de 1 000 fois supérieure à celle de *o-LH*.

La réalisation du dosage *in vitro* sur des ovocytes entourés seulement de couches folliculaires et de tissu ovarien, supprime toute possibilité d'interférence entre l'extrait à doser et la propre hypophyse de l'organisme receveur. Rappelons que l'utilisation de poissons non hypophysectomisés comme animaux test est à proscrire dans la mesure où la seule possibilité de la présence d'hormones hypothalamiques gonadotropes, effectivement détectées dans la neuropophyse de Carpe (BRETON, JALABERT, WEIL, 1972) et par conséquent présentes dans les extraits hypophysaires bruts, peut rendre compte d'une réponse apparemment aspécifique des gonades (JALABERT, 1969), mais due en fait à la faible spécificité des hormones hypothalamiques gonadotropes (BRETON *et al.*, 1972) agissant sur l'hypophyse du receveur. Les tests proposés par ROBERTSON et RINFRET (1957) et SCHMIDT *et al.*

(1965), bien que réalisés chez les poissons juvéniles, ne sont pas à l'abri de cette critique.

Un autre avantage du dosage *in vitro* est la déconnexion de l'organe récepteur, non seulement de l'hypophyse, mais aussi de l'ensemble de l'organisme dont l'état endocrinien global est variable d'un animal à l'autre et d'un moment à l'autre. Ainsi, nous avons observé *in vitro* un effet potentialisateur de l'hydrocortisone sur la maturation ovocytaire, ce qui abaisse le seuil de réponse chez la Truite comme chez le Brochet (JALABERT et BRETON, 1973), alors que l'hydrocortisone seule, à la dose utilisée (0,5 µg/ml) ne provoque aucune maturation. On peut penser que l'hydrocortisone joue un rôle de précurseur préférentiel dans l'élaboration du médiateur stéroïdien agissant sur la maturation, au contraire du cholestérol. Il peut en aller de même pour d'autres stéroïdes et en particulier les corticostéroïdes d'ailleurs directement impliqués dans la maturation ovocytaire chez certaines espèces comme *Heteropneustes fossilis* (SUNDARARAJ et GOSWAMI, 1971). Or l'équilibre des corticostéroïdes est fortement perturbé chez les poissons d'eau douce hypophysectomisés, maintenus en eau salée isotonique pour assurer leur survie. Ainsi, le test de spermiation du Poisson rouge, mis en œuvre par YAMAZAKI et DONALDSON (1968) apporte une simplification et un gain de temps considérables par rapport au critère d'hydratation du testicule des Poissons initialement décrit par CLEMENS et SNEED (1962), avec en outre une garantie de rigueur supplémentaire apportée par l'hypophysectomie préalable des animaux-tests ; mais ceux-ci sont probablement encore, comme nous l'avons souligné, dans un état endocrinien complexe, d'autant plus qu'ils sont réutilisés jusqu'à 6 fois après hypophysectomie, pour des tests différents. La variabilité qui pourrait en résulter doit être en fait masquée par le mode d'appréciation de la spermiation (—, + ou ++) pondéré sur 5 individus ; il en résulte que ce test prometteur est encore relativement peu sensible et gros consommateur d'hormone : 50 p. 100 de spermiation pour des doses d'une préparation d'hormone gonadotrope de Saumon de l'ordre de 3 µ/g pour 10 g de poids corporel, alors que la préparation SG-G₁₀₀, moins purifiée, donne une DE₅₀ de l'ordre de 0,08 µg/ml par le test de maturation *in vitro* des ovocytes de Truite.

Le critère de maturation ovocytaire, tout comme celui de la spermiation est indéniablement représentatif de toute l'activité gonadotrope hypophysaire, dans la mesure où l'on admet à l'heure actuelle qu'il n'existerait qu'une seule hormone gonadotrope chez les Téléostéens (BURZAWA-GERARD et FONTAINE, 1972 ; SUNDARARAJ, ANAND et DONALDSON, 1972 ; BURZAWA-GERARD, 1973). Ainsi, l'hormone gonadotrope purifiée de Carpe, *c-GtH*, active à la fois sur la spermatogenèse (BILLARD BURZAWA-GERARD, BRETON, 1970) et la vitellogenèse (BURZAWA-GERARD, 1973) du Carassin hypophysectomisé, provoque la maturation ovocytaire *in vitro* chez la Truite, mais aussi chez le Carassin (JALABERT *et al.*, 1973 et données non publiées). Réciproquement, une décharge importante de *c-GtH* a été mise en évidence chez le Carassin avant la fraie, pendant la période de maturation ovocytaire et d'ovulation (BRETON *et al.*, 1972).

En outre, le phénomène de maturation paraît effectivement spécifique de l'activité gonadotrope hypophysaire, à l'exclusion de toute autre hormone hypophysaire, puisque un extrait brut d'hypophyses de Carpe, saturé par un anticorps spécifique de l'hormone *c-GtH* perd toute activité sur la maturation *in vitro* des ovocytes de Truite, de même qu'un extrait brut d'hypophyses de Truite saturé par un

anticorps dirigé contre l'extrait SG-G₁₀₀ (BRETON, JALABERT, données non publiées).

Enfin, le critère de maturation ovocytaire *in vitro* présente l'énorme avantage de la sensibilité (DE₅₀ de 0,07 µg/ml pour c-GtH et 0,08 µg/ml pour SG-G₁₀₀) sur les autres systèmes de dosages jusqu'à présent pratiqués pour l'hormone gonadotrope des Téléostéens. Cette sensibilité peut être encore pratiquement doublée par l'adjonction d'hydrocortisone ou éventuellement d'autres stéroïdes, non actifs directement, au milieu d'incubation.

La précision du dosage qui dépend d'une part du choix de l'échelle des dilutions du standard et des extraits à doser et d'autre part du nombre d'ovocytes par essai est satisfaisante dans les conditions que nous avons choisies, mais peut être adaptée à certaines exigences expérimentales. Il serait cependant difficile et criticable de chercher à utiliser sans précautions la maturation *in vitro* des ovocytes pour le dosage de l'hormone gonadotrope dans le plasma, dans la mesure où certains stéroïdes éventuellement présents, comme les progestagènes, ont un effet propre sur la maturation *in vitro* (JALABERT, BRETON, BRY, 1972 ; JALABERT *et al.*, 1973 ; FOSTIER, JALABERT, TERQUI, 1973) et pourraient interférer avec l'effet de l'hormone gonadotrope à doser. Ceci paraît donc limiter l'utilisation du dosage aux extraits hypophysaires.

Des inconvénients majeurs tiennent peut-être à la durée d'incubation de 4 jours à 10°C pour obtenir le résultat du dosage et surtout au nombre limité d'ovocytes offert par chaque femelle (de 1 000 à 7 000 suivant la taille). L'obtention de chaque DE₅₀ avec une précision suffisante exige l'incubation d'une dizaine de coupelles contenant 25 ovocytes, soit 250 ovocytes. La variabilité individuelle dans le seuil de réponse oblige à répéter chaque fois le dosage de la préparation standard. Une femelle donnant 3 000 ovocytes permet donc, outre le standard, la réalisation de 15 dosages environ. Enfin, le choix des femelles au stade favorable (vésicule germinale périphérique) peut paraître difficile. En fait, il suffit de disposer d'un stock de géniteurs suffisant et de choisir les femelles à sacrifier d'après l'état de quelques ovocytes prélevés par massage abdominal.

CONCLUSION

Dans l'ensemble, malgré les quelques inconvénients évoqués, la méthode de dosage biologique des hormones hypophysaires gonadotropes de Poisson par le critère de maturation *in vitro* des ovocytes de Truite présente une spécificité, une sensibilité et une précision qui n'ont jamais été obtenues avec d'autres tests.

Reçu pour publication en octobre 1973.

REMERCIEMENTS

Le traitement statistique des résultats a été effectué grâce aux conseils et directives de M^{lle} Aline SOLARI. L'entretien des Truites femelles jusqu'au stade convenable de maturité ovarienne (vésicule germinale périphérique) a été assuré sous la direction de M. CARPENTIER par B. BONICEL et G. DAURAT.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une action thématique programmée « Physiologie Écologique » du C. N. R. S. (contrat 4404).

SUMMARY

FISH GONADOTROPHINS BIOASSAY USING *IN VITRO* MATURATION
OF TROUT OOCYTES

The criteria of *in vitro* maturation of Trout oocytes has been used to develop a bioassay for fish gonadotrophins. Each hypophysial extract or hormone was submitted to serial dilutions. The effect of each dilution was tested on lots of 25 oocytes each in the peripheral germinal vesicle stage, and incubated for 4 days at 10°C. (fig. 2).

For each extract, a characteristic regression line was calculated by probit transformation of the observed maturation percentages (fig. 1), leading to the precise determination of the theoretical median efficient dose (MED or dose inducing 50 p. 100 maturations), with its confidence limits. The results obtained with different extracts on oocytes from the same female could be compared (fig. 3, tabl. 1). For instance, *c-GtH* (Carp gonadotrophin) and Salmon pituitary extract SG-G₁₀₀, with a MED respectively of 0,067 µg/ml and 0,083 µg/ml were found to be 1 000 times more efficient than the mammalian hormone *o*-LH. Because the ratio of effectiveness between pairs of extracts remained unchanged, it was possible to compare series of dosages on oocytes from different females, in reference to a standard gonadotrophin preparation tested on each female.

The sensivity of the test was sufficient to determine the gonadotrophic activity in the pituitary from a single immature trout. This sensivity may be doubled by the addition of hydrocortisone (0,5 µg/ml) in the incubation medium (tabl. 3).

The proposed bioassay appears to be sensitive and precise, specific and representative of the gonadotrophic activity in Salmonids. It may also be applied to Carp and eventually to other fishes with the risk of a decreased sensivity due to species specificity. But this assay is not directly applicable to plasma dosage and must be limited to dosage of pituitary extracts.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BILLARD R., BURZAWA-GERARD E., BRETON B., 1970. Régénération de la spermatogenèse du Cyprin hypophysectomisé *Carassius auratus* L. par un facteur gonadotrope hautement purifié de Carpe. *C. R. Acad. Sci. D.*, **271**, 1896-1899.
- BRETON B., BILLARD R., JALABERT B., 1973. Spécificité d'action et relations immunologiques des hormones gonadotropes de quelques Téléostéens. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **13**, 347-362.
- BRETON B., BILLARD R., JALABERT B., KANN G., 1972. Dosage radiimmunologique des gonadotropines plasmatiques chez *Carassius auratus*, au cours du nyctémère et pendant l'ovulation. *Gen. Comp. Endocr.*, **18**, 463-468.
- BRETON B., JALABERT B., WEIL C., 1972. Caractérisation partielle d'un GoRF chez la Carpe, *Cyprinus Carpio* L. *Colloque D. G. R. S. T. Biologie de la Reproduction et du Développement*. Gif sur Yvette, 1972.
- BRETON B., WEIL C., JALABERT B., BILLARD R., 1972. Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Bélier et de Poissons Téléostéens sur la sécrétion *in vitro* des hormones gonadotropes *c*-HG et LH respectivement par des hypophysés de Carpe et de Bélier. *C. R. Acad. Sci. D.*, **274**, 2530-2533.
- BURZAWA-GERARD E., 1971. Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de Poisson Téléostéen, la Carpe (*Cyprinus carpio*). *Biochimie*, **53**, 545-552.
- BURZAWA-GERARD E., 1973. *Étude biologique et biochimique de l'hormone gonadotrope d'un Poisson Téléostéen, la Carpe (Cyprinus carpio L.)*. Thèse Université Paris VI., C. N. R. S., n° A. O. 8228.
- BURZAWA-GERARD E., FONTAINE Y. A., 1972. The gonadotrophins of lower vertebrates. *Gen. Comp. Endocr.*, suppl. 3, 715-728.
- DONALDSON E. M., YAMAZAKI F., DYE H. M., PHILLEO W. W., 1972. Préparation of gonadotrophin from salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. *Gen. Comp. Endocr.*, **18**, 469-481.
- FINNEY D. J., 1962. *Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press.
- FONTAINE Y. A., SALMON C., FONTAINE-BERTRAND E., BURZAWA-GERARD E. et DONALDSON E. M., 1972. Comparison of the activities of two purified fish gonadotrophins on adenylyl-cyclase activity in the goldfish ovary. *Can. J. Zool.*, **50**, 1673-1676.

- FOSTIER A., JALABERT B., TERQUI M., 1973. Action prédominante d'un dérivé hydroxylé de la progestérone sur la maturation *in vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel. *C. R. Acad. Sci. D.*, **277**, 421-424.
- GONTCHAROV B. F., 1971. *Étude des transformations de l'ovocyte d'Amphibien et d'Esturgeon de la phase de croissance à la phase de maturation.* Thèse Acad. Sci. U. R. S. S., Moscou, Institut de la Biologie et du Développement.
- JALABERT B., 1969. Réponse de l'ovaire de *Poecilia reticulata* (Poisson Téléostéen vivipare) normal ou hypophysectomisé à des injections d'extraits hypophysaires bruts de Gardon et de Gambusie. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 315-328.
- JALABERT B., BRETON B., 1973. *In vitro* maturation of Pike (*Exos Lucius*) oocytes. *7th Conf. European Comparative Endocrinologists, Budapest.*
- JALABERT B., BRETON B., BRY C., 1972. Maturation et ovulation *in vitro* des ovocytes de la Truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*. *C. R. Acad. Sci. D.*, **275**, 1139-1142.
- JALABERT B., BRY C., SZÖLLÖSI D., FOSTIER A., 1973. Étude comparée de l'action des hormones hypophysaires et stéroïdes sur la maturation *in vitro* des ovocytes de la Truite et du Carassin. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **13**, hors-série 59-72.
- ROBERTSON O. H., RINFRET A. P., 1957. Maturation of the infantile testes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) produced by salmon pituitary gonadotrophins administered in cholesterol pellets. *Endocrinology*, **60**, 559-561.
- SCHMIDT P. J., MITCHELL B. S., SMITH M., TSUYUKI H., 1965. Pituitary hormones of the pacific salmon. I. Response of gonads in immature trout (*Salmo gairdneri*) to extracts of pituitary glands from adult pacific salmon (*Oncorhynchus*). *Gen. Comp. Endocr.*, **5**, 197-206.
- SUNDARARAJ B. I., ANAND T. C., DONALDSON E. M., 1972. Effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on ovarian maintenance, ovulation and vitellogenesis in the hypophysectomized catfish (*Heteropneustes fossilis* (BLOCH)). *Gen. Comp. Endocr.*, **18**, 102-114.
- SUNDARARAJ B. I., GOSWAMI S. V., 1971. Effects of desoxycorticosterone and hydrocortisone singly and in various combinations on *in vitro* maturation of oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (BLOCH). *Gen. Comp. Endocr.*, **17**, 570-573.
- THORNTON V. F., 1971. A bioassay for progesterone and gonadotropins based on the meiotic division of *Xenopus* oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocr.*, **16**, 599-605.
- YAMAZAKI F., DONALDSON E. M., 1968. The spermiation of goldfish (*Carassius auratus*) as a bioassay for salmon (*Oncorhynchus tsawvyscha*) gonadotropin. *Gen. Comp. Endocr.*, **10**, 383-391.
-