

Implication du complexe majeur d'histocompatibilité dans la variabilité de la réponse immunitaire humorale à la choriogonadotropine équine (eCG/PMSG) chez les caprins : approche génétique

F. ROY (1), M.C. MAUREL (1), D. VAIMAN (2), E. CRIBIU (2), I. LANTIER (3), Y. COMBARNOUS (1), F. GUILLOU (1)

(1) INRA, URA CNRS 1291, Station PRMD, 37380 NOUZILLY (France)

(2) INRA, LGBC, 78352 Jouy (France)

(3) INRA, Station PII, 37380 Nouzilly (France)

RESUME – Dans le cadre de la pratique de l'Insémination Artificielle (IA) chez la chèvre, les traitements hormonaux utilisés pour l'induction et la synchronisation de l'oestrus et de l'ovulation, comportent la pose d'une éponge vaginale imprégnée d'un progestagène (acétate de fluorogestone) et l'injection d'hormone choriogonadotropine équine (eCG, dénommée aussi PMSG). L'administration successive de ces deux produits mime ainsi les mécanismes endocriniens qui contrôlent les cycles sexuels. Chez certaines femelles l'injection de eCG entraîne dès le premier traitement l'apparition d'anticorps anti-eCG à des taux très variables selon les individus. La conséquence en est une baisse de la fertilité après IA lors du traitement suivant, pouvant aller jusqu'à 20 %. L'étude de la réponse immunitaire humorale chez des chèvres traitées une fois par an, au cours de quatre années consécutives, a montré que les femelles ayant développé une très faible réponse immunitaire après un premier traitement continuaient à présenter une très faible réponse lors des traitements suivants. A l'inverse, des femelles ayant une forte réponse immunitaire après un premier traitement, présentaient systématiquement une forte réponse lors des traitements suivants. Nous avons alors recherché l'origine des phénotypes «fort ou faible répondeur» en faisant l'hypothèse qu'elle pouvait impliquer le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Nous avons recherché s'il existait un polymorphisme génétique dans la région du CMH pouvant être lié au caractère fort ou faible de la réponse immunitaire apparaissant suite à un traitement avec eCG.

Nos travaux obtenus avec le microsatellite caprin OLADRB, situé dans la région DRB du CMH de classe II, ont montré une liaison significative ($p < 0,05$) entre le locus OLADRB et le phénotype de la réponse immunitaire anti-eCG. Ces résultats suggèrent fortement l'implication du CMH de classe II dans la variabilité de la RIH anti-eCG.

Implication of MHC in the variability of the humoral immune response against the equine choriogonadotropin (eCG/PMSG) in goat : genetic approach

F. ROY (1), M.C. MAUREL (1), D. VAIMAN (2), E. CRIBIU (2), I. LANTIER (3), Y. COMBARNOUS (1), F. GUILLOU (1)

(1) INRA, URA CNRS 1291, Station PRMD, 37380 NOUZILLY (France)

SUMMARY – In dairy goats, hormonal treatments are necessary for out of season breeding and artificial insemination (AI). The most efficient hormonal treatment to achieve induction and synchronisation of estrus and ovulation remains the association between a progestagen (FGA : Fluorogestone Acetate) delivered by a vaginal sponge and injection of eCG, previously known as pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). In some goats, during the first or following treatments, injection of eCG induced secretion of anti-eCG antibodies in variable levels. This humoral immune response is associated with a decreased fertility after the next hormonal treatment and AI.

Analysis of anti-eCG immune response in the same animals treated once a year, over four years demonstrated that goats eliciting a low humoral immune response after the first treatment were also poor responders after the following treatments. Conversely, goats with a strong immune response at the first treatment systematically yielded higher immune response during following treatments. The origin of «high and low responder» phenotypes was researched and the major histocompatibility complex (MHC) was considered as a good candidate. An association between genetic polymorphism of MHC region and the variability of anti-eCG immune response was investigated.

Preliminary results obtained with caprin OLADRB microsatellite located inside the DRB class II MHC region displayed a significant association ($p < 0,05$) between some alleles of this OLADRB microsatellite and anti-eCG response phenotype. Our results strongly suggest the class II MHC implication in the anti-eCG immune response level.

INTRODUCTION

La maîtrise de la fonction de reproduction dans les élevages caprins modernes nécessite l'utilisation de traitements hormonaux permettant l'induction et la synchronisation de l'oestrus et de l'ovulation indispensables à la pratique de l'Insémination Artificielle (IA). Ces traitements comportent la pose d'une éponge vaginale imprégnée d'un progestagène (acétate de fluorogestone) et l'injection d'hormone choriogonadotropine équine (eCG, dénommée aussi PMSG pour Pregnant Mare Serum Gonadotropine), et miment ainsi les mécanismes endocriniens qui contrôlent les cycles sexuels. Chez les caprins, l'IA est pratiquée de façon systématique, 43 heures (race Alpine) ou 45 heures (race Saanen) après la fin du traitement hormonal. Cependant, l'utilisation répétée de la eCG au cours de la vie de l'animal, est généralement suivie d'une baisse de la fertilité après IA, pouvant aller jusqu'à 20% (Baril et al., 1993 et 1996). Des travaux ont montré l'apparition d'une liaison plasmatique anti-eCG, mesurée par dosage radio-immunologique (RIA), suite à la répétition de traitements avec eCG (Baril et al., 1992 - 1996). Cette observation a été corrélée à une baisse de fertilité chez les animaux traités et inséminés. La mise au point d'un dosage immunoenzymatique (ELISA) permettant de quantifier la concentration en anticorps anti-eCG dans le plasma (Maurel et al., 1994) a permis de démontrer et d'analyser finement la réponse immunitaire humorale (RIH) mise en place suite au traitement par eCG chez les chèvres traitées (Roy et al., 1995). Les résultats obtenus montrent que la chronologie de la réponse immunitaire est identique chez toutes les chèvres contrairement au taux de sécrétion des anticorps qui est très variable d'une femelle à l'autre, quel que soit le nombre de traitements précédemment reçus. L'apparition des anticorps anti-eCG circulants débute 10 jours après l'injection chez les femelles n'ayant jamais été traitées et 7 jours après l'injection de eCG chez les femelles ayant déjà été traitées. De plus, les résultats obtenus par technique RIA puis par ELISA ont permis d'établir clairement d'une part, que le taux de liaison ou la concentration en anticorps résiduels, mesurés avant l'administration du traitement, augmentaient de façon significative avec le nombre de traitements reçus et d'autre part, que ces anticorps étaient à l'origine d'une baisse de la fertilité après IA. Celle-ci est associée à un retard important du moment d'apparition de l'oestrus (Baril et al., 1993) et du pic préovulatoire de LH ce qui entraîne un retard du moment de l'ovulation (Roy et al., en cours de publication). La conséquence en est une baisse de fertilité du fait de la pratique systématique de l'IA à un moment prédéterminé par rapport à la fin du traitement hormonal.

Dans ce travail, nous avons étudié sur un même lot de femelles la répétabilité individuelle de l'intensité de la réponse immunitaire anti-eCG en les traitant une fois par an et ce, pendant quatre années consécutives. Nous avons ensuite recherché l'origine du caractère 'fort ou faible répondeur' en faisant l'hypothèse que le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) pouvait en être le facteur responsable. En effet, le CMH est impliqué dans la réponse immunitaire humorale vis-à-vis de nombreux antigènes. L'indisponibilité d'outils sérologiques permettant de typer les antigènes du CMH chez la chèvre nous a conduits à aborder cette étude en utilisant l'approche des microsatellites. En effet, l'établissement de la première carte de liaison génétique caprine a permis de localiser un microsatellite, OLADRB, dans la région du CMH de classe II chez la chèvre (Vaiman et al., 1996).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. MÉTHODE IMMUNOENZYMATIQUE DE DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-eCG

Cette méthode utilise une technique ELISA réalisée sur plaques de microtitration de 96 puits. Les puits sont préalablement sensibilisés avec de la eCG sur laquelle sont ensuite incubés les plasmas de chèvres dilués. La présence d'anticorps liés à la eCG adsorbée est révélée en incubant un deuxième anticorps anti-IgG de chèvre conjugué à la peroxydase. Une réaction colorée est obtenue après ajout d'un substrat spéci-

fique de la peroxydase, l'ABTS; son intensité est proportionnelle aux complexes anticorps-antigène formés. L'utilisation d'une gamme étalon réalisée à partir d'un anticorps polyclonal anti-eCG servant de standard, permet une détermination quantitative de la concentration plasmatique (exprimée en µg/ml) des anticorps anti-eCG chez les femelles traitées.

1.2. ÉTUDE DE LA RÉPÉTABILITÉ INDIVIDUELLE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTI-eCG

Douze chèvres alpines, n'ayant reçu aucun traitement préalable avec eCG, ont été traitées une fois par an durant 4 années consécutives, en période d'anoestrus saisonnier avec 500 UI de eCG (Synchro-Part, Sanofi) injectée par voie I.M. Pour chaque expérience, la concentration plasmatique des anticorps anti-eCG a été dosée à partir de prélèvements sanguins effectués avant l'injection de eCG puis 2 fois par semaine pendant 8 semaines afin de suivre et comparer la RIH de chaque femelle sur ces 4 années.

1.3. ANALYSE DU POLYMORPHISME DES MICROSATELLITES OLADRB ET BM1258

Animaux : cette étude a été réalisée à partir de 2 lots de 50 chèvres réparties dans 9 élevages différents et caractérisées par une faible ou une forte réponse immunitaire anti-eCG. Ces deux lots de femelles ont été constitués à partir des concentrations en anticorps anti-eCG mesurées 10 jours après l'injection de l'hormone. A cette date, la sécrétion d'anticorps anti-eCG est maximale et permet de discriminer au mieux les femelles faibles ou fortes répondeuses.

Extraction d'ADN génomique : elle a été réalisée à partir du sang de ces femelles selon la méthode de Jeanpierre (1987).

PCR : les microsatellites OLADRB et BM1258 ont été amplifiés en utilisant les amorces spécifiques préalablement décrites par Vaiman et al (1996). Brièvement, la PCR est réalisée à partir de 100 ng d'ADN dilués dans 10 µl d'un tampon 67mM Tris HCl pH 8.8 - 16mM (NH₄)₂SO₄ - 0.01 % Tween 20 - 2mM MgCl₂ - 150µM dNTP (Dupont). Juste avant la réaction de polymérisation marquée par l'addition de 1.3 unité de DNA polymérase (Eurobio), les échantillons sont incubés 2 mn à 94°C selon la technique de «hot-start» (Erlich et al. 1991) puis 30 sec à 94°C, 15 sec à 58°C et 20 sec à 72°C durant 30 cycles. Les échantillons amplifiés sont ensuite analysés sur un séquenceur automatique ABI 377 (Perkin Elmer). La taille des fragments est déterminée à l'aide du logiciel Genescan Analysis version 2.0.2 (Perkin Elmer).

2. RESULTATS

2.1. RÉPÉTABILITÉ INDIVIDUELLE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTI-eCG

L'étude de la réponse immunitaire humorale chez des chèvres traitées une fois par an, au cours de quatre années consécutives, a montré que les femelles ayant développé une très faible réponse immunitaire humorale anti-eCG après un premier traitement continuaient à présenter une très faible réponse au cours des traitements suivants (Figure 1, femelles 372 et 914). A l'inverse, des femelles ayant une forte réponse immunitaire après un premier traitement, présentaient systématiquement et de façon amplifiée une forte réponse au cours des traitements suivants (Figure 1, femelle 375). Ainsi, pour l'ensemble des animaux, les moyennes des concentrations en anticorps anti-eCG mesurées à J10 pendant les quatre années consécutives ont été de 2.1 ± 2.8, 3.5 ± 3.5, 3.9 ± 3.3 et 2.2 ± 1.1 µg/ml chez les faibles répondeuses et 21.5 ± 19, 37.7 ± 9.5, 144 ± 134 et 92.8 ± 58.4 µg/ml chez les moyennes et fortes répondeuses.

Ces résultats nous ont conduits à l'hypothèse que le phénotype de la réponse immunitaire anti-eCG pouvait être dépendant du CMH, impliqué dans la présentation des peptides dérivés d'antigènes.

2.2. LIAISON ENTRE MARQUEUR DU CMH ET RÉPONSE IMMUNITAIRE ANTI-eCG

Nous avons choisi d'étudier la variabilité du CMH au niveau génétique du fait de l'impossibilité de pouvoir typer les antigènes du CMH par des techniques sérologiques classiques chez la chèvre. La présence du microsatellite OLADR B situé sur le chromosome 23 dans la région DRB du CMH de classe II chez la chèvre, nous a permis de rechercher s'il existe un polymorphisme génétique dans cette région pouvant être lié au caractère fort ou faible de la RIH anti-eCG. Un microsatellite contrôle, BM1258 situé à 13cM de OLADR B, mais en dehors de la région du CMH, a été utilisé également. Les deux lots de chèvres étaient caractérisés par une concentration en anticorps anti-eCG supérieure à 30 µg/ml pour les fortes répondeuses ou inférieure à 6 µg/ml pour les faibles répondeuses. Le taux de fertilité, après traitement et IA, était de 74 % pour les faibles répondeuses contre 53 % chez les fortes répondeuses.

Les résultats ont montré un très grand polymorphisme du marqueur OLADR B puisque 12 allèles ont été identifiés dans les 2 lots de femelles, avec une taille variant de 276 à 306 paires de bases (pb). La fréquence de distribution des allèles a montré des différences importantes entre les deux lots de femelles, particulièrement pour 3 allèles (Figure 2A). L'allèle 280 pb a présenté une association significative (test de chi², p<0.05) avec le phénotype faible répondeuse : parmi les chèvres portant l'allèle 280 (n=32) 68 % d'entre elles avaient un phénotype faible répondeuse. A l'inverse, les allèles 288 pb et 295 pb ont présenté une association significative (p<0.05) avec le phénotype forte répondeuse. Ainsi, parmi les femelles portant les allèles 288 pb (n=23) et 295 pb (n=14), 67 % et 79 % d'entre elles respectivement, avaient un phénotype forte répondeuse.

Avec le microsatellite contrôle BM1258, les résultats obtenus dans les 2 lots de femelles ont mis en évidence 5 allèles. Leur taille varie de 101 à 113 pb. Contrairement à OLADR B, la fréquence de distribution des différents allèles de BM1258 n'a montré aucune différence entre les 2 lots expérimentaux, traduisant l'absence d'association avec les phénotypes fort ou faible répondeuse.

Figure 1

Quelques profils types de la répétabilité de la réponse immunitaire humorale anti-eCG chez des chèvres traitées une fois par an et pendant quatre années consécutives (les flèches indiquent le moment d'injection de 500 UI de eCG) (d'après Roy et al. 1999)

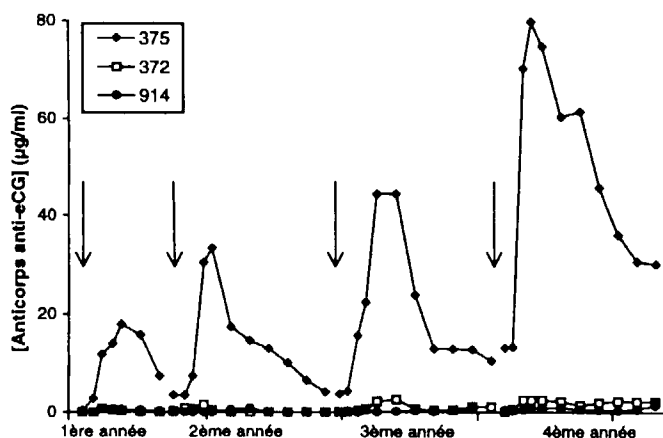
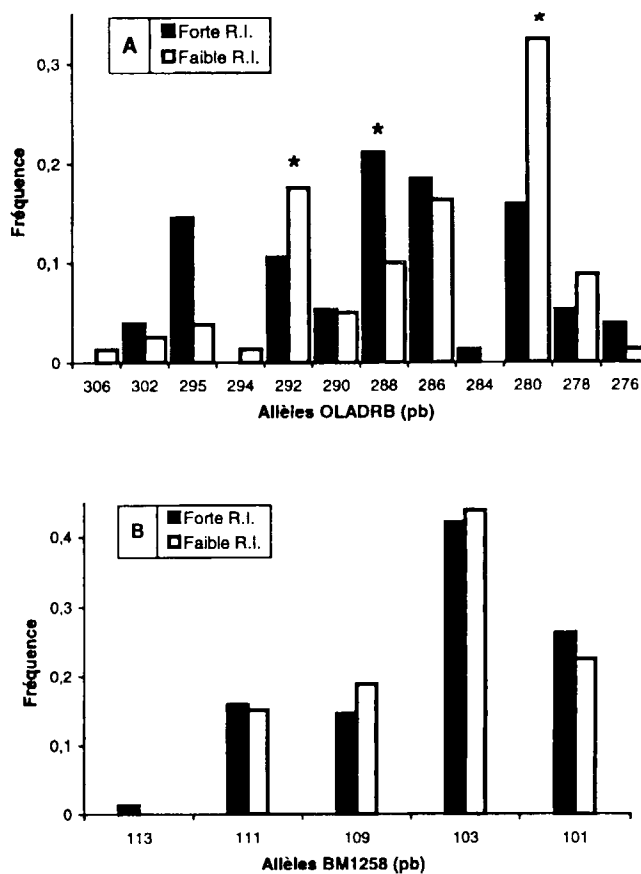


Figure 2

Fréquence des différents allèles des microsatellites OLADR B situé dans le CMH (A) et BM1258 situé en dehors du CMH (B) chez des chèvres présentant une forte ou une faible RIH anti-eCG (* p<0.05) (d'après Roy et al. 1999)



CONCLUSION

L'étude de la réponse immunitaire humorale anti-eCG mise en place chez des chèvres traitées pendant quatre années consécutives, a montré que chaque femelle répondait en termes de taux de sécrétion d'anticorps anti-eCG, de façon semblable d'un traitement à l'autre. Ces résultats ont fait ressortir que chaque femelle présentait soit un phénotype « forte » ou « faible répondeuse », mettant en évidence un déterminisme génétique de ce caractère. Nous avons trouvé pour la première fois une liaison significative entre l'expression de certains allèles du microsatellite OLADR B situé dans la région DRB du CMH de classe II et le phénotype de la RIH anti-eCG. Il sera nécessaire de répéter cette étude à partir de familles informatives en typant et en caractérisant le phénotype de la RIH anti-eCG de filles de boucs d'I.A. préalablement choisis en fonction de leurs allèles OLADR B.

- Baril G., Remy B., Vallet J.C ; Beckers J.F. 1992. *Reprod. Dom. Anim.*, 27, 161-168
 Baril G., Leboeuf B., Saumande J. 1993. *Theriogenology*, 40, 621-628
 Baril G., Remy B., Leboeuf B., Beckers J.F., Saumande J. 1996. *Theriogenology*, 45, 1553-1559
 Erlich H.A., Gelford D., Sninsky J.J. 1991. *Science*, 252, 1643-1651.
 Jeanpierre M. 1987. *Nuc. Ac. Res.*, 15, 9611.
 Maurel M.C., Figueiredo F.V.J., Remy B., Beckers J.F., Baril G., Leboeuf B., Combarous Y. 1994. *Journées du CRIT ISIS*
 Roy F., Maurel M.C., Combarous Y., Briois J.P., Pobel T., Deletang F. 1995. *Renc. Rech.Ruminants*, 2, 395-398
 Roy F., Maurel M.C., Combes B., Vaimand., Cribiu E.P., Lantier I., Pobel T., Deletang F., Combarous Y., Ouillou F. 1999. *Biol. Reprod.* (accepted).
 Vaiman D., Schibler L., Bourgeois F., Oustry A., Amigues Y., Cribiu E.P. 1996. *Genetics*, 144, 279-305