Table des matières

Remerciements ii

Résumé iii

Table des matières iv

Liste des tableaux vii

Liste des figures viii

Liste des abréviations, sigles et symboles x

Chapitre 1 : Revue de littérature 1

- Introduction 2
- La croissance et son contrôle 2
  - Facteurs exogènes influençant la croissance 3
  - Facteurs endogènes influençant la croissance 4
- L'hormone de croissance (GH) 5
  - Évolution de la GH 6
  - Actions de la GH 6
  - Facteurs influençant la GH 9
- La mesure de la GH par radioimmunoessai 12
- La croissance compensatoire 13
- L'omble de fontaine 17

Chapitre 2 : Matériel et méthodes 18

- Prélèvements et préparation des échantillons 19
  - Provenance des ombles de fontaine 19
  - Plasma provenant d'expériences de CC 19
  - Prélèvement de plasma d'omble de fontaine 21
  - Prélèvement d'hypophyses d'omble de fontaine et homogénéisation 22
  - Concentration de molécules plasmatiques et d'homogénats d'hypophyses 23

- Purification de GH *S. fontinalis* via FPLC 23
- Électrophorèses et Western-blots 24
    - Électrophorèses 24
    - Western-blots 26
    - Évaluation du poids moléculaire 27
- Procédure pour le RIA 27
    - Marquage de la GH saumon/truite 27
    - Dosages en RIA 28
    - Comparaison des techniques RIA 30
    - Validation du RIA 30

Chapitre 3 : Reconnaissance de la GH par l'anti-GH saumon/truite et réactivité croisée avec la PRL 32

- Reconnaissance de la GH saumon/truite par l'anti-GH correspondant 33
- Présence de GH dans l'hypophyse de *S. fontinalis* 34
- Interactions croisées avec anti-PRL et PRL *S. fontinalis* 35
- Réactivité croisée anti-GH saumon/truite et PRL *S. fontinalis* en RIA 39

Chapitre 4 : Purification et caractérisation partielle de la GH *S.fontinalis* 41

- Confirmation de la présence de GH dans l'hypophyse de *S. fontinalis* 42
- Purification de la GH *S. fontinalis* sur colonne FPLC 43
- Évaluation d'autres approches et mise au point de la technique 45
- Étude et caractérisation de la GH *S. fontinalis* 47

Chapitre 5 : Développement et validation d'un RIA hétérologue afin de mesurer la GH chez *S. fontinalis* 52

- Validation de la stabilité du traceur 53
- Étude de recouvrement de la GH saumon/truite 54
- Limites de détection 56
- Dosage de la GH *S. fontinalis* 57
- Efficacité de la technique RIA pour doser la GH chez *S. fontinalis* 59

Chapitre 6 : Discussion générale **63**

- La GH chez *S. fontinalis* et son rôle dans la CC 64
- Teneurs de GH en circulation 65
- Utilisation d'un RIA hétérologue 67
    - L'efficacité d'un RIA hétérologue 67
    - Interaction avec la PRL 69
- Dégradation des protéines 70
- Possibilités de recherche et autres approches 73

Bibliographie **75**

Liste des tableaux

Tableau 3-1 : Degré de réaction observé en western-blot, avec anti-GH saumon/truite et anti-PRL *S. fontinalis,* sur les échantillons testés 39

Tableau 4-1: Dosages en RIA avec anti-GH saumon/truite d'homogénats d'hypophyses *S. fontinalis* (P1 et P2) et concentrés 10-30 kDa de ces homogénats 43

Tableau 5-1 : Étude de recouvrement à partir de plasma d'ombles de fontaine 55

Tableau 5-2 : Limites de détection des RIA et valeurs pour le blanc, zero et total..... 57

Tableau 5-3 : Compilation des limites de détection des RIA 57

Liste des figures

Figure 1-1 : Effets de la GH chez les poissons, incluant l'action intermédiaire des IGF..... 7

Figure 1-2 : Régulation et effets de la GH à l'intérieur de l'axe GH-IGF..... 8

Figure 1-3 : Modèle de la régulation neuroendocrinienne de la sécrétion de GH..... 11

Figure 1-4 : Représentation du phénomène de CC..... 14

Figure 2-1 : Plan expérimentale d'induction de CC chez *S. fontinalis*..... 20

Figure 2-2 : Prélèvement sanguin effectué chez *S. fontinalis* selon la technique décrite.... 21

Figure 2-3 : Localisation de l'hypophyse chez *S. fontinalis*..... 22

Figure 3-1: GH saumon/truite a) coloration au bleu de Coomassie et b) Western-blot avec l'anti-GH correspondant..... 34

Figure 3-2 : a) Électrophorèses SDS-PAGE et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite faits sur homogénat de cerveau (HC), homogénat d'hypophyses (HP) et concentré d'homogénat (10-30 kDa)..... 35

Figure 3-3 : PRL recombinante a) bleu de Coomassie et b) Western-blot avec anti-PRL.. 36

Figure 3-4 : PRL a) en bleu de Coomassie et b) Western-blot avec anti-PRL, dans des homogénat de cerveau (HC), homogénat d'hypophyses (HP) et concentré d'homogénat (10-30 kDa)..... 37

Figure 3-5 : Reconnaissance de la GH saumon/truite par l'anti-PRL *S. fontinalis*..... 38

Figure 3-6 : Reconnaissance de la PRL recombinante *S. fontinalis* par l'anti-GH saumon/truite..... 38

Figure 3-7: Dosage de la PRL avec RIA hétérologue utilisant l'anti-GH saumon/truite.... 40

Figure 4-1 : Tamisage moléculaire d'extrait d'hypophyses sur gel Sephadex G-75 (colonne 1,6 x 90 cm) avec tampon 0,05 M ammonium acétate pH 9,0..... 44

Figure 4-2 : a) SDS-PAGE et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite sur fractions (#1 à 6), homogénat d'hypophyses (HP), GH saumon/truite (GH) et homogénat de cerveau (HC) suivant l'élution de la Fig. 4-1 45

Figure 4-3 : Tamisage moléculaire d'extrait d'hypophyses sur gel Sephadex G-75 (colonne 1,6 x 90 cm) avec tampon 0,05 M ammonium acétate pH 9,0 46

Figure 4-4 : a) SDS-PAGE et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite sur fractions (#1 à 8), homogénat d'hypophyses (HP), GH saumon/truite (GH) et standard (Std) suivant l'élution de la Fig. 4-3 47

Figure 4-5 : Western-blot avec anti-GH saumon/truite, suivant des gels SDS-PAGE Bis-tris 4-12 % avec et sans agent réducteur 48

Figure 4-6 : a) Coloration bleu Coomassie et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite, suivant électrophorèse sur gel Tris-Gly 4-20 % 50

Figure 4-7 : a) Coloration bleu Coomassie et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite, suivant électrophorèse sur gel Tris-Gly 4-20 % avec agent réducteur 51

Figure 5-1 : Courbes standard de GH saumon/truite pendant la durée des expérimentations, du marquage jusqu'à 6 semaines 54

Figure 5-2 : Recouvrement de GH saumon/truite en présence de plasma *S. fontinalis* à dilution 1/2, 1/8 ou 1/16 55

Figure 5-3 : Induction de CC chez des individus en restriction alimentaire 58

Figure 5-4 : Dosages RIA sur plasma d'omble de fontaine de diverses provenances 59

Figure 5-5 : Pentes en RIA, en comparaison avec la courbe standard GH saumon/truite... 60

Figure 5-6 : Pentes en RIA pour la courbe standard GH saumon/truite et la GH purifiée de *S. fontinalis*. 62

Liste des abréviations, sigles et symboles

%B/Bo	pourcentage de liaison par rapport au zero
CC	croissance compensatoire
Ci	curie
cpm	comptes par minute
DA	dopamine
ED	limite de dosabilité (effective dose)
ED50	dose pour laquelle une réponse est observée à 50%
ED90	dose pour laquelle une réponse est observée à 90%
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	force centrifuge
GH	hormone de croissance (growth hormone)
GHBP	protéine de liaison de l'hormone de croissance (GH binding protein)
GHR	récepteur de l'hormone de croissance (GH receptor)
GnRH	gonadolibérine (gonadotropin releasing hormone)
GRF	facteur de libération de l'hormone de croissance (growth-hormone releasing factor)
HC	homogénat de cerveau
HP	homogénat d'hypophyses
hGH	hormone de croissance humaine
I^{125}	iode 125 (radioactif)
IGF	facteur de croissance insulinomimétique (insulin-like growth factor)
IGFBP	protéine de liaison IGF (IGF binding protein)

Rapport-Gratuit.com

IgG	immunoglobulines
kDa	kilodaltons
LH	hormone lutéinisante
M	molaire
Native-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition non dénaturante
nm	nanomètre
NPY	neuropeptide Y
PBS	tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
PEG	polyethylène glycol
PMSF	phenylmethanesulphonylfluoride
PRL	prolactine
PVDF	polyfluorure de vinylidène
RIA	radioimmunoessai
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec laurylsulfate de sodium (sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SRIF	somatostatine
STD	standard
T3	triiodothyronine
T4	thyroxine
TCA	acide trichloroacétique
TRH	hormone thyréotrope (thyrotropin-releasing hormone)
V	volts
w/v	poids/volume (weight/volume)

Chapitre 1 :

Revue de littérature

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Introduction

Le but de la recherche était de doser les teneurs en hormone de croissance (GH) dans des échantillons de plasma d'ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) recueillis lors d'une étude de croissance compensatoire (CC). La CC se caractérise par une croissance accélérée lors de la réalimentation suivant un jeûne prolongé. La GH influence la croissance, le développement, ainsi que le métabolisme en général. Cette étude visait par conséquent à mieux comprendre le rôle de la GH dans la CC chez *S. fontinalis.* L'hypothèse initiale était la suivante : le phénomène de CC est corrélé avec une hausse de la GH plasmatique chez *S. fontinalis*. Le dosage de la GH chez cette espèce a donc été fait dans le but de vérifier cette hypothèse. À ce jour, aucune technique homologue n'a été mise au point pour mesurer la GH chez *S. fontinalis*. Le radioimmunoessai (RIA) hétérologue ci-développé, avec GH et anti-GH saumon/truite disponibles sur le marché, représente une alternative intéressante pour le dosage de la GH plasmatique chez cette espèce. Cette étude est la première à étudier la GH d'omble de fontaine, en l'identifiant dans l'hypophyse puis en l'isolant et la caractérisant partiellement.

La croissance et son contrôle

Les premières études portant sur la croissance des poissons ont démontré que des poissons hypophysectomisés subissaient un retard, voire même un arrêt de croissance. Ce phénomène a été observé chez plusieurs espèces, dont des salmonidés. Ces individus hypophysectomisés retrouvaient un taux de croissance normal lorsque injectés de préparations d'hypophyses ou d'hormone de croissance purifiée (Pickford et Atz 1957, Donaldson et al. 1979) suggérant un rôle probable de cette glande et cette hormone dans la régulation de la croissance somatique. L'administration de GH purifiée chez des individus

non hypophysectomisés permettait quant à elle une augmentation du taux de croissance (Marchant et al. 1986). De nos jours, la présence de la GH dans l'hypophyse est clairement établie et cette hormone est considérée comme le principal régulateur de la croissance chez les vertébrées. D'autres hormones telles les stéroïdes et les hormones thyroïdiennes ont également un impact sur la croissance. À ces facteurs endogènes s'ajoutent divers facteurs exogènes influençant la croissance des poissons à divers niveaux.

Facteurs exogènes influençant la croissance

Un rythme circannuel de croissance est présent de façon naturelle chez les poissons, principalement chez les espèces des zones tempérées soumises à des variations saisonnières marquées. La photopériode, la température et autres facteurs environnementaux sont en cause. Des manipulations photopériodiques chez plusieurs téléostéens influencent leur croissance, notamment chez la truite brune (Swift 1961), plusieurs corégonidés (Hogman 1968), chez le saumon atlantique (Björnsson 1997) et d'autres espèces (Brett 1979, Marchant et al. 1986). Une augmentation de la température provoque aussi une augmentation de la croissance, indépendamment de la photopériode (Marchant et al. 1986). Des études confirment l'influence de la température sur la croissance alors qu'elle agit sur le système endocrinien en favorisant la production d'hormones, sur le métabolisme général et sur l'apport en nourriture et sa conversion (Swift 1961, Hogman 1968, Adelman 1977, Kayes 1977). Les comportements influençant l'ingestion de la nourriture, son assimilation, les mécanismes de synthèse et autres jouent un rôle dans la croissance. Des poissons maintenus à trop forte densité et des individus subordonnés peuvent s'alimenter moins et/ou retarder la croissance des autres individus (Refstie et Kittelsen 1976). Une augmentation des rations tend à provoquer une hausse de la croissance (Pierce et al. 2001).

Des facteurs environnementaux tels que la salinité, la concentration en oxygène, l'accessibilité ainsi que la qualité de la nourriture interviennent également. Le statut sexuel de l'individu, son âge, sa taille, la présence ou absence de prédateurs/compétiteurs, la densité des individus, et bien d'autres facteurs ont aussi un impact (Brett 1979, Marchant et al. 1986, Farbridge et Leatherland 1992, Ricordel et al. 1995, Barreto et al. 2003). Bref, les conditions favorisant une croissance optimale varient pour chaque espèce et dépendent de l'historique environnemental de chaque individu.

Facteurs endogènes influençant la croissance

Le contrôle endocrinien de la croissance est soumis à divers facteurs interdépendants. Les stéroïdes, en particulier l'estradiol, jouent un rôle dans la stimulation de la croissance. L'estradiol possède également un rôle dans la maturation sexuelle en augmentant la réceptivité des somatotropes dans les gonades (Peter et Marchant 1995, Holloway et Leatherland 1998, Roberts et al. 2004). Les somatostatines (SRIF) sont des hormones peptidiques qui influencent la croissance, le développement et le métabolisme en général chez les vertébrés (Lin et al. 1993 et 2000, Agustsson et al. 2000, Agustsson et Björnsson 2000, Cameron et al. 2005) et dont la présence a été démontrée dans le cerveau de plusieurs téléostéens (Peter 1986). Les hormones triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4) peuvent aussi accroître la croissance. Ces hormones thyroïdiennes atteignent les niveaux les plus hauts en été alors que la température ambiante est maximale et que les individus se nourrissent et grandissent le plus (Peter et Marchant 1995, Cyr et al. 1998). Peter et Marchant (1995) ont montré l'importance du contrôle endocrinien de la croissance par l'axe « GH –IGF » chez la carpe. Des études ont démontré l'existence d'un lien entre le taux plasmatique d'IGF-I et la croissance somatique (Baker et al. 2000, Company et al. 2001)

alors que les IGF jouent également un rôle dans le développement sexuel et la maturation chez le saumon coho (Baker et al. 2000). Toutefois, dans certaines études sur *Sparus aurata* et le saumon coho, une corrélation entre le taux de IGF et la croissance n'a pas été observée (Meton et al. 2000, Pierce et al. 2001). Il n'en demeure pas moins que toute altération des facteurs IGF peut avoir un impact sur la croissance. Le contrôle de la croissance via les IGF dépend également des protéines de liaison IGF (IGFBP) et de leur affinité pour les IGF. Ces protéines jouent un rôle central entre les ligands IGF et leurs récepteurs, ce qui influence la distribution et la disponibilité des IGF (Pérez-Sanchez et al. 1994b). Bref, la GH joue un rôle important dans la croissance même si ses modes d'action restent à clarifier. Il est crucial de ne pas négliger aucun aspect de l'axe « croissance – système endocrinien » afin de comprendre la régulation hormonale de la croissance.

L'hormone de croissance (GH)

La première purification de GH chez un poisson remonte à 1955 (Wilhelmi, 1955). D'autres études ont suivi, notamment l'isolation de la GH chez *Tilapi mossambica* (Farmer et al. 1976), *Onchorhynchus tshawytscha* (Le Bail et al. 1989), *Gadus morhua* (Rand-Weaver et al. 1989), *Morone saxatilis* (Jackson et al. 2000) et *Hippoglossus hippoglossus* (Einarsdottir et al. 2002). Depuis, nombre d'études portant sur la GH ont eu lieu. L'hormone de croissance est produite par des cellules spécialisées, les somatotropes, présentes en plus grande quantité lors de périodes de croissance accrue et leurs fonctions cellulaires sont contrôlées par divers facteurs endocriniens (Holloway et Leatherland 1998). Le poids moléculaire de la GH varie d'une espèce à l'autre (Donaldson et al. 1979). Il est estimé pour la GH de carpe à 22,5 kDa (Cook et al. 1983) et pour le tilapia à 22,2 kDa (Farmer et al. 1976). L'événement de tétraploïdization survenu chez les salmonidés a

provoqué la duplication de la GH chez ces espèces. Ainsi, deux gènes actifs de GH sont présents et deux isoformes de GH peuvent être détectées (Le Bail et al. 1989, Sekine et al. 1989, Björnsson 1997, Oakley et Phillips 1999, McKay et al. 2004). Ceci s'observe également chez d'autres espèces, par exemple chez *Gadus morhua* où les isoformes de GH possèdent des poids moléculaires estimés de 20 et 22 kDa (Rand-Weaver et al. 1989 et 1991). Ces formes peuvent posséder des réactivités et fonctions différentes, tel que vu pour la GH humaine (Wood 2001).

Évolution de la GH

La GH et la prolactine (PRL) ont évolué à partir d'un même polypeptide ancestral et possèdent des analogies (Nicoll 1975 et 1981, Donaldson et al. 1979, Jackson et al. 2000, Soares 2004). Les régions en surface des hormones, souvent hydrophiliques, évoluent toutefois à un rythme plus rapide ce qui provoque l'accumulation de différences antigéniques. Ceci cause une divergence graduelle alors que les fonctions biologiques associées à ces régions sont modifiées (Nicoll 1981). Il semble probable que les récepteurs respectifs pour la GH et la PRL aient eux aussi évolués et que plusieurs formes structurales existent pour chacun (Nicoll 1981). Il n'en demeure pas moins que la GH et la PRL ont des champs d'action similaires, notamment au niveau des reins, de l'intestin et de la glande adrénale chez les poissons. La similitude entre ces hormones démontre le besoin de développer une méthode de mesure spécifique pour la GH, sans intéraction avec la PRL.

Actions de la GH

Les actions de la GH sont variées (Fig. 1-1) et passent d'abord par sa liaison sur les récepteurs spécifiques associés aux membranes (Peter et Marchant 1995, Ng et al. 1994,

Pérez-Sanchez et al. 1994a et 1994b, Björnsson 1997). Toute modification du nombre de récepteurs ou de leur affinité pour la GH influence l'effet de cette dernière (Peter et Marchant 1995).

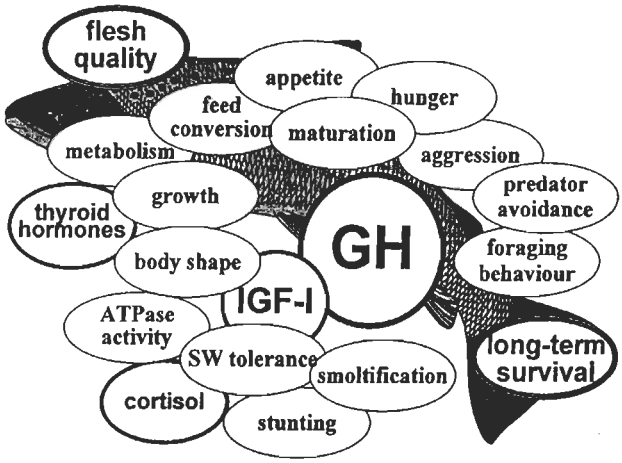

Fig. 1-1 : Effets de la GH chez les poissons, incluant l'action intermédiaire des IGF (Björnsson 1997).

La combinaison de l'action de la GH et des IGF à l'intérieur de l'axe GH-IGF est reconnue par plusieurs chercheurs (Fig. 1-2) et joue un rôle primordial dans la croissance. Lupu et al. (2001) ont démontré que cet axe est responsable à 83 % de la variabilité de croissance totale observée chez la souris. Chez les poissons, la GH agit sur la croissance notamment en stimulant l'appétit et en augmentant l'efficacité de la conversion de la nourriture (Donaldson et al. 1979, Fine et al. 1993, Johnson et al. 1996, Björnsson 1997, Holloway et Leatherland 1998, Einarsdottir et al. 2002, Jönsson et al. 2003, Nikki et al. 2004). L'administration de GH peut stimuler le transport intestinal d'acides aminés, augmenter la masse intestinale et provoquer des changements métaboliques dans le foie, les reins et le cerveau (Peter et Marchant 1995, Sangiao-Alvarellos et al. 2005) et augmenter la motivation à s'alimenter (Johnson et al. 1996, Jönsson et al. 1998 et 2003). La GH est connue pour avoir un lien direct avec la croissance en période de photopériode accrue

(Swift 1961, Hogman 1968, Brett 1979, Marchant et al. 1986, Björnsson 1997). La GH joue également un rôle dans la maturation des gonades et la reproduction chez les poissons (Danzman et al. 1990, Singh et Thomas 1993, Björnson et al. 1994, Degani et al. 1996, Gomez et al. 1998, Hull et Harvey 2000, Campbell et al. 2003), au niveau de l'osmorégulation (Ogasawara et al. 1989, Yada et al. 1994 et 2001, Sakamoto et al. 1997, Björnsson et al. 1998, Sohm et al. 1998, Agustsson et al. 2001, McCormick 2001, Sangiao-Alvarellos et al. 2005) et au niveau des comportements antiprédateur et d'agression (Johnson et al. 1996, Jönsson et al. 1998). Cette hormone joue finalement un rôle dans le système immunitaire, puisqu'un accroissement de la GH est relié à une augmentation de l'activité des phagocytes et lysosomes et provoque une hausse de l'immunoglobuline (Weigent 1996, Company et al. 2001, Yada et al. 2001). Tous ces effets peuvent être dépendants ou indépendants et le taux de GH plasmatique n'est pas toujours corrélé avec le taux de croissance observé (Marchant et Peter 1986, Marchant et al. 1986, Peter et Marchant 1995, Pierce et al. 2001) ou un délai peut être observé entre la hausse de GH et l'accroissement subséquent de la croissance (Marchant et al. 1986).

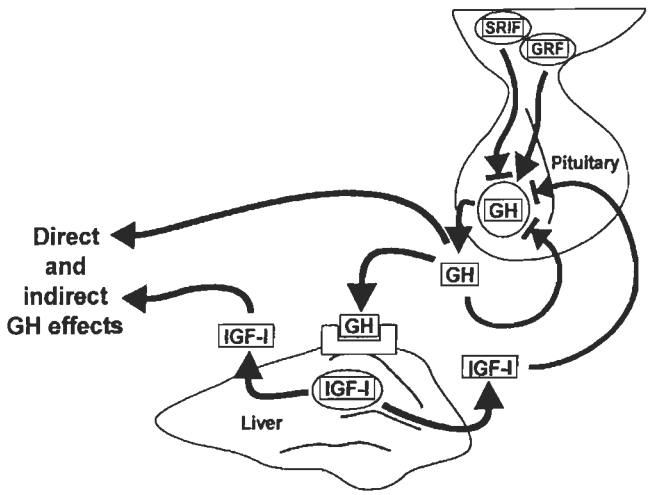

Fig. 1-2 : Régulation et effets de la GH à l'intérieur de l'axe GH-IGF (Björnsson 1997).

Facteurs influençant la GH

Les hormones en circulation dans le sang varient sur une base journalière (Boujard et Leatherland 1992, Gomez et al. 1997) et saisonnière (Marchant et al. 1986). Divers facteurs exogènes modulent les hormones et leurs effets. L'activité sécrétoire des somatotropes et le taux de GH en circulation sont corrélés avec les cycles de croissance somatique et ces variations saisonnières proviennent de modifications environnementales, notamment la photopériode, l'accès et l'abondance en nourriture, la température et la salinité (Marchant et al. 1986). Björnsson et al. (1994) ont confirmé la corrélation existant entre la GH et la photopériode chez *Salmo salar* alors que Swift et Pickford (1965) ont démontré qu'un accroissement de la température influence l'action de la GH chez *Perca fluviatilis*. Une alimentation plus riche en lipides ou pauvre en protéines semble augmenter le taux de GH plasmatique (Marti-Palanca et al. 1996, MacKenzie et al. 1998, Company et al. 1999, Cameron et al. 2002) ainsi qu'un jeûne ou une restriction alimentaire (Wagner et McKeown 1986, Farbridge et Leatherland 1992, Björnsson 1997, MacKenzie et al. 1998, Pottinger et al. 2003). Le stress diminue aussi le taux de GH en circulation (Farbridge et Leatherland 1992, Peter et Marchant 1995). Ces changements passent par une augmentation de l'affinité des tissus pour la GH plasmatique et par la stimulation de la sécrétion de GH à partir de l'hypophyse. Les récepteurs pour la GH peuvent être influencés par l'adaptation à l'eau de mer, notamment en modifiant les liaisons de la GH au niveau du foie, et par le statut nutritionnel d'un individu (Peter et Marchant 1995).

Au niveau endocrinien, la régulation de la GH est multifactorielle avec des actions stimulatrices et inhibitrices sur les somatotropes (Fig. 1-3) reliées aux taux de sécrétion et d'élimination ainsi qu'à l'efficacité des récepteurs liants la GH. Des résultats démontrent

Rapport-Gratuit.com

que la GnRH est importante dans la régulation de la GH en la stimulant, particulièrement chez les poissons en maturation ou en préponte (Marchant et al. 1986, Lin et al. 1993, Peter et Marchant 1995). Les stéroïdes, dont l'estradiol, jouent un rôle dans les changements saisonnier du taux de GH en circulation (Peter et Marchant 1995, Holloway et Leatherland 1998, Roberts et al. 2004). L'adrénaline et la sérotonine ont quant à elles un effet inhibiteur sur la GH (Marchant et al. 1986, Peter et Marchant 1995) similaire à celui des SRIF (Peter et Marchant 1995). Le neuropeptide Y (NPY) régule également la GH en modulant l'activité de la GnRH et par conséquent l'action de cette dernière sur les somatotropes. L'effet du NPY semble plus prononcé chez les individus en période de préponte, probablement dû à l'action combinée des stéroïdes sexuels (Peter et Marchant 1995). Les SRIF peuvent aussi inhiber la sécrétion de GH provenant de l'hypophyse (Lin et al. 1993 et 2000, Agustsson et al. 2000, Agustsson et Bjornsson 2000, Cameron et al. 2005) en influençant l'axe GH-IGF. Leur concentration varie de façon saisonnière inversement à celle de la GH (Peter 1986, Cameron et al. 2005). Des données démontrent que la dopamine (DA) a un effet stimulateur en limitant la sécrétion de SRIF à partir de l'hypothalamus (Marchant et al. 1986, Chang et al. 1990, Peter et Marchant 1995) alors qu'inversement les SRIF auraient un impact sur le taux de DA, GnRH et TRH (Lin et al. 2000). Des études faites sur des truites arc-en-ciel confirment l'effet inhibiteur de la DA sur la sécrétion de la GH (Agustsson et al. 2000). Les hormones thyroïdiennes T3 et T4 peuvent agir de manière synergique avec la GH pour accroître la croissance (Peter et Marchant 1995, Cyr et al. 1998). D'autres études montrent que l'IGF-I peut inhiber la sécrétion de GH en provenance de l'hypophyse (Cameron et al. 2002, Cameron et al. 2005). Suivant un jeûne ou une diminution des rations, l'abaissement des IGF peut provoquer une hausse de la GH plasmatique (Company et al. 2001, Pierce et al. 2001). Ceci explique l'élévation du taux de

GH plasmatique parfois observée alors qu'aucune augmentation de la croissance n'a lieu, provoquée par une baisse de sensibilité des récepteurs GH provenant d'une baisse des facteurs IGF-I. L'hormone lutéinisante (LH) contrôle également la sécrétion basale de GH au niveau hypophysaire (Zhou et al. 2005). La GH en circulation peut même intervenir dans la régulation de ses récepteurs et de sa porpre sécrétion (Agustsson et Bjornsson 2000, Zhou et al. 2004) puisque les protéines de liaison GH (GHBP) en circulation diminuent avec une augmentation des molécules de GH liées (Fisker 2006).

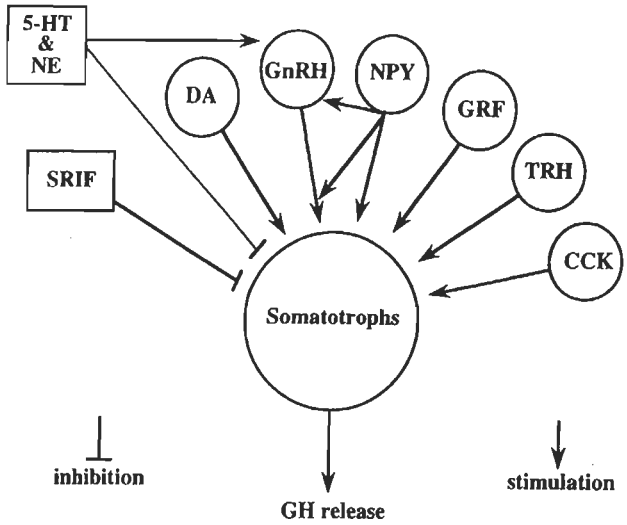

Fig. 1-3 : Modèle de la régulation neuroendocrinienne de la sécrétion de GH (Peter et Marchant 1995).

La croissance et le rôle joué par la GH sont complexes. Agustsson et al. (2000) ainsi que MacKenzie et al. (1998) soulignent que l'inconsistance observée dans les données portant sur la régulation hormonale de la GH proviendrait de différences spécifiques quant au contrôle de cette hormone. Il devient alors difficile d'appliquer les observations faites chez une espèce à une autre, et ce même pour des espèces étroitement liées.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La mesure de la GH par radioimmunoessai

Les connaissances sur la GH se sont accrues avec la purification de GH d'un nombre grandissant d'espèces, combinée au développement de techniques de mesure. Une de ces techniques est le radioimmunoessai (RIA) qui a l'avantage d'être sensible, précis et facile d'utilisation. Cette technique est couramment utilisée pour détecter des peptides et autres hormones présents en faible quantité, du nanomolaire au picomolaire (Nicoll 1975, Peake et al. 1979, Lauritzen et al. 1994). Le premier RIA homologue validé pour la GH en circulation chez un téléostéen a été développé pour le poisson rouge, *Carassius auratus* et des essais avaient été faits auparavant avec des RIA hétérologues, notamment par Cook et al. (1983). L'intérêt grandissant pour les RIA a conduit au développement d'autres RIA homologues (Bolton et al. 1986, Ayson et al. 1993, Einarsdottir et al. 2002) et hétérologues (Wagner et McKeown 1986, Le Bail et al. 1991, Ricordel et al. 1995) pour ne nommer que ceux-là. Lors du RIA, les hormones stéroides, T4, T3 et autres hormones ne semblent pas affecter les mesures de GH ou altérer l'essai (Peake et al. 1979).

Le développement d'un RIA homologue requière la purification préalable de la GH de l'espèce visée. L'utilisation de RIA hétérologues présente une alternative avantageuse en permettant une meilleure connaissance du rôle de la GH chez des espèces dont l'hormone purifiée est indisponible. Malgré certaines variations interspécifiques (Pérez-Sanchez et al. 2002), la GH des vertébrés possède des déterminants antigéniques communs (Nicoll 1975). Des résultats démontrent que la structure moléculaire générale de la GH a été conservée pendant l'évolution (Farmer et al. 1976, Chang et al. 1992, Soares 2004) suggérant la validité d'un RIA hétérologue pour doser cette hormone. Plusieurs observations ont d'ailleurs démontré que des RIA homologues existants pour la PRL et la GH peuvent être

utilisés chez d'autres espèces. Le caractère quantitatif des valeurs obtenues demeure cependant questionnable. Selon Nicoll (1975), même si un RIA développé chez une espèce apparentée est utilisé, le matériel réagissant lors de l'essai est incertain. Des résultats confirment l'efficacité de RIA hétérologues pour la reconnaissance de GH chez divers salmonidés (Bolton et al. 1986, Wagner et McKeown 1986, Le Bail et al. 1991, Ricordel et al. 1995) nottament les résultats obtenus par Farmer et al. (1976) sur la GH de tilapia qui démontrent une réactivité croisée significative chez un autre téléostéen. Nicoll (1975) a également soulevé la problématique d'une interaction possible entre la GH et la PRL lors de l'utilisation de RIA hétérologues, puisque ces hormones proviennent d'un même polypeptide ancestral (Nicoll 1975 et 1981). Malgré leur différenciation pendant l'évolution, ces hormones partagent des similarités structurales et des propriétés biologiques qui se chevauchent chez plusieurs vertébrés. Pérez-Sanchez et al. (1994b) ainsi que Ricordel et al. (1995) démontrent néanmoins dans leurs études que les récepteurs de GH ne reconnaissent pas la PRL, du moins chez *Sparus aurata* et *Oreochromis niloticus*.

La croissance compensatoire

La croissance compensatoire (CC) se définie comme une période de croissance accrue suivant une période de sous-nutrition (Hayward et al. 1997) ou de perte de poids suivant la reproduction (Broekhuizen et al. 1994, Jobling et Koskela 1996, Jobling et al. 1999) et s'observe autant chez des adultes que chez des juvéniles (Mangel et Munch 2005) (Fig. 1-4). Nombre d'études confirment que la CC permet à un animal de récupérer en partie ou en totalité le retard de croissance subit, autant chez des animaux de ferme (Prince et al. 1983, Plavnick et Hurwitz 1985, Santoso et al. 1995) que chez divers poissons incluant des salmonidés (Miglavs et Jobling 1989, Dobson et Holmes 1994, Jobling et

Koskela 1996, Nikki et al. 2004). La majorité des études ont été effectuées sur des espèces piscicoles d'eau froide douce ou salée. Dans certains cas, les individus peuvent même atteindre une taille finale supérieure à celle du groupe contrôle, tel que vu chez des hybrides *Lepomis* (Hayward et al. 1997) et chez *Gadus morhua* (Bélanger et al. 2002).

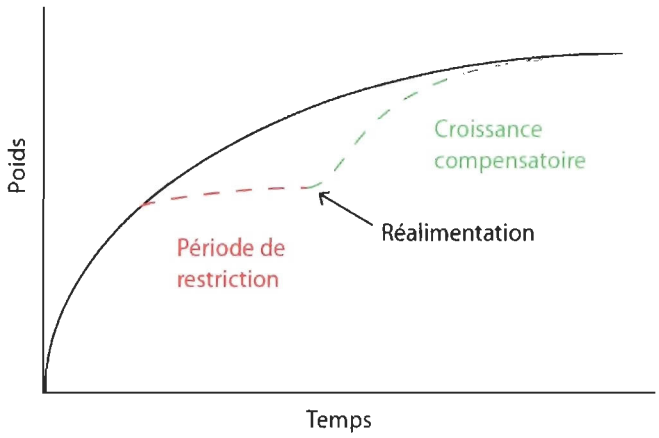

Fig. 1-4 : Représentation du phénomène de CC (Le François, communication personnelle).

Le retard de croissance accumulé peut être regagné si la période de privation n'excède pas une certaine durée, chaque espèce pouvant tolérer une période de privation qui lui est propre. Cette période dépend également de la condition physique initiale des individus et des conditions de maintien. Une étude menée par Kim et Lovell (1995) montre que *Ictalurus punctatus* peut rattraper le retard de croissance seulement si la période de restriction alimentaire ne dépasse pas trois semaines. Tian et Qin (2003) notent quant à eux que lorsque le poids de *Lates calcarifer* en privation chute sous les 60 % du poids des individus contrôles, ceux-ci ont de faibles chances de rattraper ce retard de croissance même lorsque remis dans des conditions optimales. Le degré de CC observé est donc dépendant de la durée ainsi que du degré de restriction alimentaire (Hayward et al. 1997, Pierce et al. 2001, Bélanger et al. 2002, Tian et Qin 2003 et 2004, Ali et al. 2006).

L'augmentation de croissance suivant la réalimentation ne s'observe pas toujours dès le changement alimentaire. Dans certains études, le phénomène de CC a été observé une semaine suivant la réalimentation chez les épinoches (Zhu et al. 2001) et jusqu'à quatre semaines plus tard pour *Lates calcarifer* (Tian et Qin 2004). Ce retard s'observe également au niveau du taux de la GH plasmatique, avec un délai entre le début de la restriction alimentaire et la modification du taux de l'hormone en circulation (Pottinger et al. 2003).

Suivant une période de restriction alimentaire, les meilleurs taux de croissance sont observés lorsque les individus peuvent manger à satiété (Kim et Lovell 1995). La majorité des études dénotent un accroissement de l'appétit lors de la période de réalimentation (Kim et Lovell 1995, Hayward et al. 1997, Gaylord et Gatlin III 2000 et 2001, Chatakondi et Yant 2001, Nikki et al. 2004, Tian et Qin 2004, Zhu et al. 2004), parfois exclusivement chez les mâles tel que vu chez le tilapia (Barreto et al. 2003). Les études portant sur le taux de conversion de la nourriture pendant la période de réalimentation sont toutefois contradictoires. Certaines démontrent une meilleure conversion et assimilation de la nourriture (Russell et Wooton 1992, Gaylord et Gatlin III 2000 et 2001, Bélanger et al. 2002, Barreto et al. 2003) et d'autres non (Kim et Lovell 1995, Nikki et al. 2004, Tian et Qin 2004). Ces divergences peuvent provenir de différences entre les espèces, dans les contraintes alimentaires, les conditions d'élevage, les méthodes d'expérimentation et autres.

L'utilisation de la CC peut s'avérer avantageuse en aquaculture en favorisant une plus grande croissance des poissons (Hayward et al. 1997, Bélanger et al. 2002) ou en augmentant l'efficacité de conversion de la nourriture et en diminuant les quantités requises (Russell et Wooton 1992, Gaylord et Gatlin III 2000 et 2001, Bélanger et al. 2002, Barreto

et al. 2003) sans toutefois avoir d'impact sur la masse musculaire des individus (Gaylord et Gatlin III 2000 et 2001). Puisque la nourriture constitue une dépense majeure en aquaculture, un meilleur rendement est souhaitable au plan économique. Kim et Lovell (1995) ont toutefois démontré que la quantité totale de nourriture consommée par *Ictalurus punctatus* est la même pour la durée totale de l'expérience. Les portions non administrées pendant la restriction alimentaire seront utilisées plus tard durant la période d'alimentation *ad libitum*, alors que les poissons ont un appétit accru. Cependant, des périodes de jeûne contrôlé peuvent être utilisées efficacement pour réduire la tâche de travail nécessaire au maintien des stocks de poissons sans toutefois nuire, à long terme, à leur croissance. Un autre problème rencontré en aquaculture est la variation de taille des individus au sein d'un même groupe. Ce phénomène s'observe lorsque tous les individus n'ont pas accès à la nourriture de façon équitable, nottament à cause de rations insuffisantes, de la dominance de certains individus ou d'une mauvaise répartition de la nourriture. La CC représente donc un recours intéressant pour permettre aux individus plus petits de rattraper le retard de croissance lorsque séparés du groupe et nourris *ad libitum*. Chez l'omble de fontaine, une étude témoigne en effet du phénomène de CC avec rattrapage subséquent (Le François et al. 1999). Puisque les besoins en nutriments et en protéines diffèrent pendant les périodes de forte croissance pour répondre aux besoins accrus (Gaylord et Gatlin III 2001) la composition de la nourriture utilisée pendant les périodes de réalimentations devrait être ajustée pour optimiser le phénomène de CC. Cependant, peu d'études s'y sont attardées et celle de Gaylord et Gatlin III (2001) ne confirme pas cette approche chez *Ictalurus punctatus*. La plus grande demande est alors comblée avec une meilleure assimilation et rétention des nutriments et protéines ou encore l'ingestion d'une plus grande quantité de nourriture. Puisque les poissons montrent des périodes cycliques de croissance et d'appétit

en nature (Sahin et al. 2000, Skalski et al. 2005, Ali et al. 2006), une méthode d'alimentation pour en tirer avantage devrait toutefois être appliquée. Malgré les bénéfices possibles de l'utilisation de la CC en aquaculture, ce phénomène et les mécanismes d'action en cause demeurent peu connus. Une augmentation de l'appétit et/ou de la conversion de la nourriture explique souvent la rapide augmentation de taille et de poids. Cependant, le contrôle hormonal de ces changements demeure méconnu. Il est primordial de comprendre le phénomène de CC pour une espèce visée avant de pouvoir l'utiliser efficacement en aquaculture, notamment le rôle de la GH.

L'omble de fontaine

L'omble de fontaine, *Salvelinus fontinalis,* est l'espèce d'eau douce la plus commune dans la région atlantique (MAPAQ 2006). Elle fait partie de la famille des salmonidés qui se divise en trois sous-familles, dont les Salmoninae. À l'intérieur de cette sous-famille sont présents six genres de truites, saumons et ombles. L'omble de fontaine est important en aquaculture puisqu'elle constitue la principale espèce produite au Québec et est également l'un des poissons de pêche sportive les plus prisés au monde (MAPAQ 2006). Chez *S. fontinalis*, il existe des différences génétiques entre les individus résidents et ceux anadromes (Boula et al. 2002). Les individus résidents tendent à être plus petits que les individus anadromes, alors que ces derniers montrent des taux de croissances supérieurs (Power 1980). Ces derniers représentent une cible de choix pour la sélection et l'utilisation du phénomène de CC. Un tel phénomène chez *S. fontinalis* représente donc une opportunité de recherche intéressante vu l'importance grandissante de cette espèce en aquaculture au Québec. L'approfondissement de ces connaissances passe par l'étude de la GH, principale hormone reconnue pour moduler la croissance chez les vertébrés.

Chapitre2 :

Matériel et méthodes

Prélèvements et préparation des échantillons

Provenance des ombles de fontaine

Le plasma provenant d'expériences de CC a été prélevé sur des ombles de fontaine gardés en eau douce provenant de la Pisciculture Marinard Aquaculture (Gaspé, QC). Les expériences d'induction du phénomène de CC s'y sont déroulées entre mai et septembre 2004. Des juvéniles ayant un poids initial moyen de 80,2 g et une taille initiale moyenne de 19,3 cm ont été utilisés. Pour les études de GH effectuée à l'Institut Maurice-Lamontagne (IML, Mont-Joli, QC), les têtes congelées utilisées ont été fournies par un poissonnier local qui a congelé les têtes à -20°C suivant la décapitation des poissons. Les têtes ont ensuite été transférées à -40 °C au site de recherche. Cette approche a été choisie vu la facilité d'approvisionnement et les grandes quantitées disponibles. Les ombles de fontaine vivants servant aux prélèvements sanguins et d'hypophyses provenaient de piscicultures locales (Ferme Relais Inc. Dégelis, QC et Pisciculture du Lac Hudon Inc. St-Anaclet, QC). Les individus mesuraient en moyenne 15,5 cm et 20,3 cm respectivement et étaient maintenus en eau douce dans des bassins intérieurs. Les ombles de fontaines de Dégelis étaient visuellement plus actifs et en meilleure santé (pas de blessures, nageoires érodées ou autre). Deux piscicultures ont été sélectionnées afin de valider les observations faites en comparant divers stock de poissons.

Plasma provenant d'expériences de CC

Les échantillons proviennent des études effectuées à la Pisciculture Marinard Aquaculture. La CC a été induite chez deux groupes de *S. fontinalis* soumis à une restriction alimentaire différente, en comparaison avec un troisième groupe contrôle. Chaque groupe était divisé en trois sous-groupes comportant 100 poissons, pour un total de

Rapport-Gratuit.com

900 individus. Les poissons ont été maintenus à température ambiante et sous photopériode naturelle. Le groupe contrôle a été alimenté *ad libitum* pendant la totalité de l'expérience. Les groupes en induction de CC ont été alimentés *ad libitum* pendant leur période de réalimentation minimale de 32 jours suivant leur jeûne respectif de quatre ou huit semaines. Des prélèvements ont été effectués à divers moment durant l'expérience, soit au temps zéro et ensuite dès qu'une différence significative de taille a été observée entre les deux groupes en jeûne et celui contrôle. Le schéma de la fig. 2-1 résume la procédure. Des échantillons de sang ont été prélevés par ponction dans la veine caudale aux dates suivantes : 26 juin, 17-20-24-30 août et 7-21 septembre, pour un total de sept jours de prélèvement. Une centrifugation de 10 min à 1 500 *g* et 4 °C a permis de conserver le plasma qui fut ensuite congelé à -60 °C. Afin de préserver son intégrité, 10 µl d'aprotinine à 1,6 mg/ml ont été ajoutés pour inhiber l'activité protéasique. Les prélèvements ont été effectués à la même heure pendant toute la durée de l'expérience, afin de limiter l'interférence provenant de variations journalières dans le taux d'hormones en circulation.

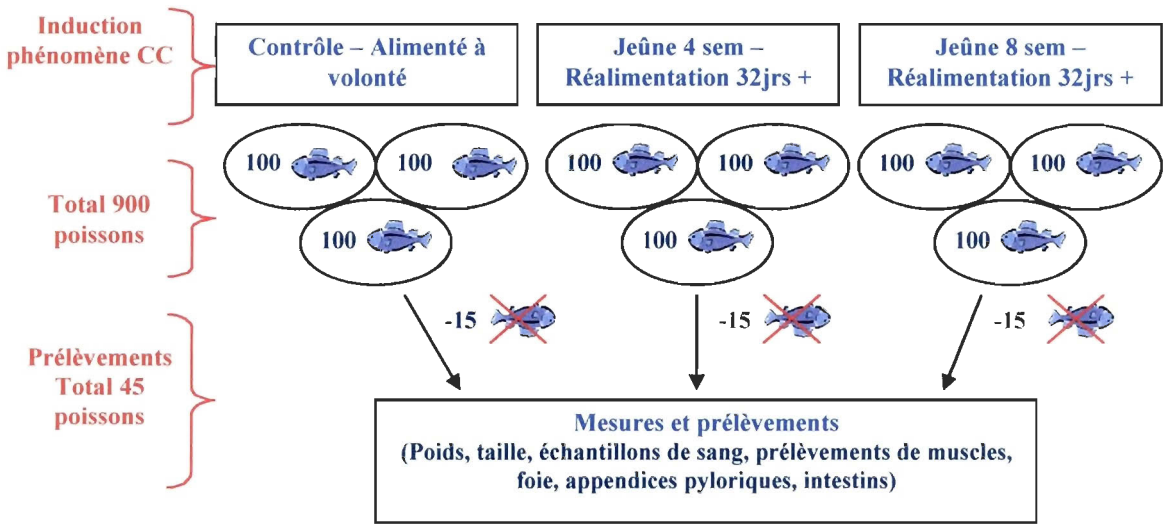

Fig. 2-1 : Plan expérimentale d'induction de CC chez *S. fontinalis*.

Prélèvement de plasma d'omble de fontaine

Des prélèvements sanguins ont été effectués à l'IML sur des ombles de fontaine préalablement placés sous anesthésie profonde dans une solution de tricaine methane sulfonate (MS 222, 75 mg/l). Chaque individu a été mesuré et pesé. Le sang a été prélevé par ponction dans la veine caudale à l'aide d'une seringue de 5ml héparinée avec une solution d'héparine à 3 mg/ml (Fig. 2-2). Il a ensuite été déposé dans des cryovials contenant une solution d'héparine 3 mg/ml et d'aprotinine 1,6 mg/ml. Les échantillons ont immédiatement été conservés sur glace jusqu'à la fin des prélèvements puis centrifugés à 3 000 *g* pendant 15 minutes à 4 °C afin de récupérer le plasma. Ce dernier a été aliquoté et congelé à -80 °C. Suivant le prélèvement sanguin, les individus ont été sacrifiés et leur sexe déterminé par analyse visuelle des gonades. À partir de ces échantillons, des dosages sur des dilutions successives de plasma ont été réalisés à l'aide du RIA développé et seront détaillés dans la section appropriée.

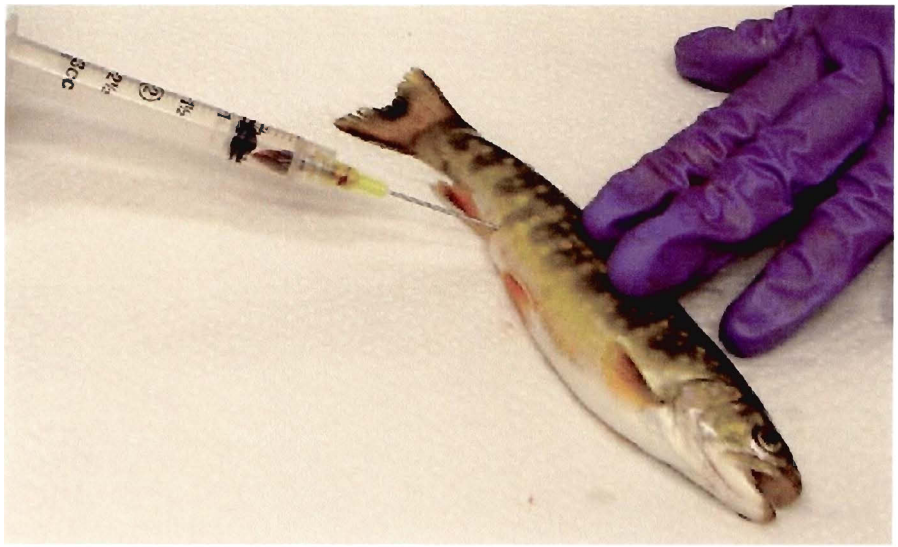

Fig. 2-2 : Prélèvement sanguin effectué chez *S. fontinalis* selon la technique décrite.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Prélèvement d'hypophyses d'omble de fontaine et homogénéisation

Des quantités variables d'hypophyses ont été prélevées à partir de têtes d'omble de fontaine congelées et fraîches (Fig 2-3). Les hypophyses ont été extraites dès la décongélation des têtes ou dès la mort du poisson, suivant son euthanasie par une surdose de tricaine méthane sulfonate (MS 222, 100 mg/l). Par la suite, les hypophyses ont été homogénéisées pour usage immédiat ou placées dans des cryovials et congelées à -80 °C. L'homogénéisation des glandes se fait dans du tampon 0,05 M ammonium acétate (pH 9,0) additionné de 0,005 M EDTA et 1 mM PMSF. Environ 1 ml de tampon par gramme de matériel a été utilisé. La solution stock 200 mM PMSF a été faite dans l'éthanol parce que sa demi-vie en solution aqueuse est de 60 min. L'homogénat d'hypophyses a été agité doucement pendant 1 h, puis centrifugé à 12 000 *g* pendant 30 min afin de conserver le surnageant. Toutes les manipulations ont été effectuées à 4 °C.

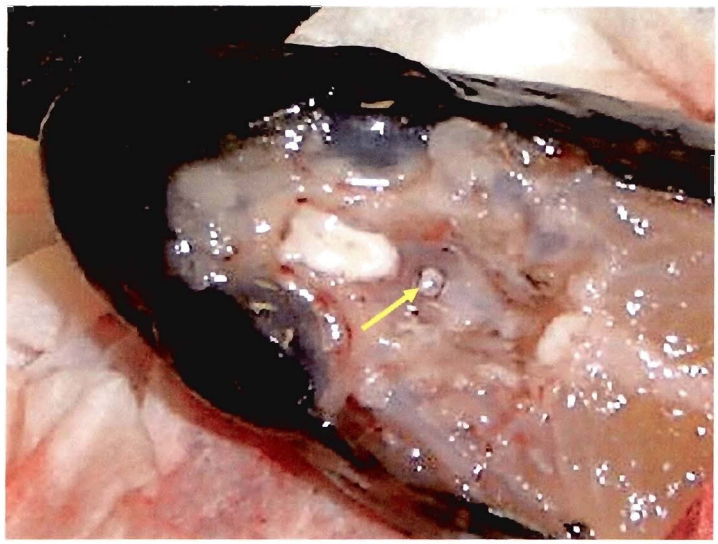

Fig. 2-3 : Localisation de l'hypophyse chez *S. fontinalis*.

Concentration de molécules plasmatiques et d'homogénats d'hypophyses

Une partie des échantillons de plasma prélevés ainsi que des homogénats d'hypophyses ont été passés sur filtre Amicon-Ultra afin de concentrer les molécules dont la masse moléculaire se situe entre 10-30 kDa ou 10-100 kDa. Cette manipulation devait permettre de concentrer la GH dont le poids estimé pour d'autres espèces de salmonidés se situe dans cet intervalle. Un tampon à base de PBS (pH 7,5) a été utilisé lors de ces filtrations. Chaque échantillon a été préalablement dilué dans le tampon puis passé sur les filtres. Les centrifugations ont été effectuées à 3 500 *g* et à 4 °C, le temps nécessaire afin de passer la solution de plasma sur le filtre de haut poids moléculaire. Le filtrat a par la suite été passé sur le second filtre pour obtenir le concentré désiré. Ces concentrés ont été aliquotés et conservés à -80 °C ou utilisés immédiatement lorsque possible.

Purification de GH *S. fontinalis* via FPLC

Des homogénats de pituitaires ont subi une filtration partielle sur filtre Amicon-Ultra 10 kDa. Ceci a permis à la fois de réduire le volume d'échantillon et d'éliminer les plus petites molécules. Une fois prêt, le surnageant a directement été appliqué sur la colonne de gel afin de procéder au tamisage moléculaire. Un volume variant entre 1 ml et 2 ml a été déposé à chaque élution selon une procédure semblable à celle de Einarsdottir et al. (2002) c'est-à-dire sur une colonne de gel Sephadex G-75 mesurant 1,6 x 90 cm. Le tampon qui a été utilisé est le même que celui pour l'homogénéisation, soit un tampon 0,05 M ammonium acétate (pH 9,0) tel qu'utilisé par d'autres chercheurs (Rand-Weaver et al. 1989, Kawauchi et al. 2002). L'élution a été faite à un débit de 2,4 ml/h et à 4 °C, avec lecture d'absorbance à 280 nm. Des fractions de 1,5 ml ont été recueillies. Les fractions d'intérêt ont été regroupées puis passées sur filtre Amicon-Ultra 10 kDa afin de concentrer

les molécules. Ces échantillons ont ensuite été aliquotés et utilisés immédiatement pour étude subséquente, congelés à -80 °C ou lyophilisés pour un entreposage de plus longue durée. Les fractions pour lesquelles des pics d'absorbance ont été observés ont été testées afin de valider celles contenant de la GH. Des fractions subséquentes ont également été sélectionnées pour fins de contrôle, afin de confirmer si de la GH s'y trouvait ou non. Ces diverses fractions ont été analysées sur gel SDS-PAGE puis en Western-blot avec anti-GH saumon/truite, avec une approche semblable à celle de Rand-Weaver et al. (1989). La calibration initiale de la colonne à l'aide des standards sélectionnés (Ribonuclease A, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, Albumin et Bleu Dextran) a rendu possible la sélection des fractions aux alentours de 20 kDa, poids moléculaire spéculé pour la GH *S. fontinalis*.

Électrophorèses et Western-blots

Électrophorèses

Des électrophorèses SDS-PAGE ont été faites en condition réductrice sur gel 4-12 % Bis-Tris avec tampon NuPAGE MOPS. Le tampon d'échantillon utilisé est le NuPAGE LDS sample buffer auquel l'agent réducteur NuPAGE a été ajouté dans une proportion 2,5:1. Les échantillons ont été chauffés pendant 10 min à 70 °C. L'électrophorèse a été effectuée à 200 V environ 1h30, jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel afin d'obtenir la meilleure séparation possible. Le gel a ensuite été coloré ou transféré sur membrane pour effectuer une analyse en Western-blot. La coloration a été effectuée pendant 30 min à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie R-250 à 0,1 % diluée dans du méthanol 40 % et de l'acide acétique 10 %. Le gel a été décoloré par rinçages successifs dans une solution de rinçage (40 % méthanol et 10 % acide acétique). Une série d'électrophorèses en condition non dénaturante a été faite sur gel Native-PAGE Tris-

Glycine 4-20 %. Un tampon de migration Tris-Glycine a été utilisé (25 mM Tris Base et 192 mM Glycine) et un tampon d'échantillon Tris-HCl contenant 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % glycérol et 0,01 % bleu de bromophénol. La migration des échantillons a été faite à 125 V pendant 2h30-3h jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Une série d'électrophorèses supplémentaires a aussi été réalisée sur gel SDS-PAGE Bis-Tris gradient 4-12 %, mais en omettant l'agent réducteur dans les échantillons. Des tests sur gels Tris-Glycine 4-20 % suivant les procédures ci-haut, mais en condition réductrice, ont également été faits. Ceci avait pour but de confirmer les données obtenues quant à la présence d'agrégats de GH et d'étudier le type de liaisons pouvant causer leur formation.

Le dosage des protéines dans les échantillons a été fait selon la microméthode de Bradford avec réactif Bio-Rad. Les courbes standard ont été générées avec des quantités connues de BSA allant de 0 à 100 µg/ml. Ceci a permis de charger une quantité connue de protéines sur les gels, en utilisant un volume fixe de 20 µl pour chaque puit. L'utilisation d'un standard a permis d'estimer le poids moléculaire de chaque bande observée pour les gels SDS-PAGE. Le marqueur de poids moléculaires Mark-12 (Invitrogen) a été sélectionné puisqu'il permet de bien identifier les protéines autour de 20 kDa, poids probable pour la GH *S. fontinalis*. Dans tous les cas, des contrôles négatifs et positifs ont été fais afin de valider chaque électrophorèse ou Western-blot effectué. Le contrôle positif reposait sur l'utilisation de la GH saumon/truite (GroPep), soit 10 µg préalablement reconstitué dans 10 µl d'eau distillée (protocole GroPep) et subséquemment utilisée à la concentration désirée. Le contrôle négatif utilisait des homogénats des lobes supérieur du cerveau (cerebrum et medulla) puisque ces structures ne contiennent pas suffisamment de

GH pour que celle-ci soit détectée. Ces homogénats ont été faits selon la procédure décrite pour les hypophyses, dans les mêmes conditions.

Western-blots

Les protéines séparées par électrophorèse ont été transférées sur membrane PVDF, pendant 1 h à 30 V ou durant la nuit à 15 V, en utilisant le tampon de transfert NuPAGE. Les sites non-spécifiques sur la membrane ont ensuite été bloqués en la faisant tremper dans une solution de blocage, pendant la nuit à 4 °C ou 1 h à température ambiante sur plaque giratoire. La détection de la GH d'omble de fontaine a été faite en incubant la membrane 1 h avec l'anti-GH saumon/truite dilué à 1/1000. La détection de PRL a été faite avec l'anti-PRL dirigé contre la PRL recombinante pour *S. fontinalis* (gracieusement fournis par Mme Céline Audet, UQAR, QC). La membrane a ensuite été incubée 1 h dans une solution d'anti-IgG de lapin conjugué à 1/1000. La membrane a été rincée à trois reprises entre chaque étape. Les bandes ont ensuite été révélées avec le substrat SureBlue Reserve TMB. Les solutions utilisées pour le processus (blocage, rinçage, révélation des bandes) proviennent de la compagnie KPL (Protein Detector Western-blot Kit) et ont été préparées suivant leur protocole. Le poids moléculaire des diverses protéines ainsi séparées a été estimé en utilisant le standard colorimétrique ProSieve (compagnie Cambrex) puisqu'il permet de bien cibler les bandes d'intérêt aux alentours de 20 kDa.

Dans chacun des cas, les contrôles positifs utilisant soit la GH saumon/truite ou la PRL *S. fontinalis* ont été utilisés. Une fois la bonne réactivité de l'anti-GH démontrée sur les homogénats d'hypophyses, ceux-ci ont également servi de contrôle positif. La GH recombinante saumon/truite possède un poids moléculaire de 21,49 et est pure à 98 %. La

PRL recombinante possède un poids moléculaire apparent de 55 kDa puisque rattachée au vecteur pMAL^{TM}-c2 (Mbow 1999).

Évaluation du poids moléculaire

La méthode d'estimation du poids moléculaire des bandes observées, en Western-blot ou SDS-PAGE, repose sur la distance de migration des standards sur le gel ou la membrane. Ces mesures servent à générer une courbe standard qui permet ensuite de déduire le poids moléculaire des bandes d'intérêt selon leur position. Une nouvelle courbe standard est générée pour chaque gel.

Procédure pour le RIA

Marquage de la GH saumon/truite

La méthode utilisée repose sur l'utilisation de la chloramine-T qui favorise la substitution d'^{125}I sur les résidus de tyrosine de la molécule. La GH recombinante marquée est celle de saumon/truite fournie par la compagnie GroPep et leur protocole #3 400 a servi de référence pour les manipulations. Les manipulations ont été effectuées à température ambiante. Tout d'abord, 90 µl de phosphate de sodium 0,5 M (pH 7,5) et 1 mCi Na^{125}I ont été ajoutés à 10 µg de GH saumon/truite reconstituée dans 10 µl d'eau distillée. La réaction a été démarrée par l'ajout de 20 µl de chloramine-T à 0,6 mg/ml. Cette solution a été agitée doucement pendant 60 sec puis la réaction d'iodation stoppée par l'ajout de 20 µl métabisulphite de sodium à 0,9 mg/ml. Une fois la réaction d'iodation complétée, l'antigène marqué forme un composé hautement stable et efficace comme traceur qu'il faut alors isoler. Pour ce faire, la solution résultante a été passée sur gel sephadex G-100 dans une colonne de 30 x 1,5 cm. Lors de la chromatographie, un tampon 50 mM phosphate de

sodium, avec 0,25 % (w/v) BSA et 150 mM chloride de sodium a été utilisé (pH 6,5). L'élution a été effectuée à 0,20 ml/min. Afin de conserver uniquement l'hormone marquée, 80 fractions de 0,5 ml ont été récupérées et analysées sur compteur gamma. Seules les fractions contenant la GH marquée et dont plus de 95 % du traceur précipite en présence d'acide trichloroacétique (TCA) 99 % (w/v) ont été retenues pour utilisation subséquente lors des RIA. Ces fractions ont été regroupées, aliquotées puis conservées à -20 °C jusqu'à utilisation. Selon GroPep, le marqueur ainsi préparé doit être utilisé dans un délai de quatre semaines. Les expérimentations effectuées pendant ce projet ont cependant démontré une bonne efficacité du marqueur jusqu'à six semaines.

Dosages en RIA

Le protocole #3 002 de la compagnie GroPep a servi de référence pour l'élaboration du RIA. Un tampon 30 mM phosphate de sodium de pH 7,5 additionné de protamine sulphate 0,2 g/l, 10 mM EDTA, 0,5 ml Tween-20 et 0,25 g/l azide de sodium a été utilisé lors des RIA. La solution traceur est constituée de GH saumon/truite préalablement marquée à l'^{125}I selon la procédure décrite précédemment. Les dosages ont été faits en triplicat, sauf lorsque l'échantillon à doser n'était pas disponible en quantité suffisante. Au besoin, les échantillons ont été dilués de façon successive avec tampon RIA afin d'obtenir une série de concentrations différentes. Chaque RIA s'étend sur trois jours consécutifs. Au premier jour, un volume fixe de 50 µl d'échantillon et 50 µl d'anti-GH dilué à 1/25 000 ont été ajoutés à chaque tube de polypropylène de 5 ml utilisé. Suivant une période d'incubation d'environ 18 h à 4 °C, 50 µl de solution traceur est ajoutée au deuxième jour. La solution est préparée juste avant utilisation afin d'obtenir approximativement 20 000 cpm pour 50 µl de solution. Suivant une seconde incubation d'environ 16 h à 4 °C, 50 µl d'anti-IgG 1/100

000 et 25 µl d'IgG à 0,1 mg/ml ont été ajoutés au troisième jour. Une solution de polyéthylène glycol (PEG) a été utilisée 30 min après la fin de la réaction pour provoquer la précipitation du traceur lié et permettre le décompte sur compteur gamma (Packard Instrument Co., Modèle 5 003, Montréal, Qc). Afin de favoriser la précipitation, cette étape a été effectuée à 4 °C en utilisant une solution de PEG préalablement refroidie. Les tubes ont été centrifugés à 3 500 *g* pendant 45 min à 4 °C puis le surnageant a été retiré. Les comptes ont servi à déterminer la portion de GH-^{125}I présente dans les culots.

Pour préparer la courbe standard GH saumon/truite, la GH lyophilisée a été diluée de façon successive afin d'obtenir dix standards variants de 2 000 pg/200µl à 3,9 pg/200µl. Les blancs ont été préparés en omettant l'ajout d'échantillon et d'anti-GH. Toutes les valeurs obtenues ont été corrigées pour tenir compte des interactions non spécifiques en soustrayant le blanc. Les données servant à tracer les courbes ont été transformées en semi-log afin d'obtenir une régression linéaire. La capacité de liaison (%B/Bo) a été déterminée à l'aide de l'équation :

$$\% \frac{B}{B_0} = \left(\frac{\text{cpm corrigé}}{\text{cpm}_0 \text{ corrigé}} \right) \times 100$$

où « cpm corrigé » représente les comptes corrigés des standards ou des échantillons et « cpm_0 corrigé » correspond aux comptes corrigés du zéro. Les courbes standard ont été obtenues en portant à l'ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations de GH en abscisse (échelle logarithmique). Les concentrations nominales des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard. Les ordonnées à l'origine (ED 20, ED 50 et ED 80) ont été calculés afin d'évaluer la qualité et la reproductibilité des courbes. La sensibilité ED 90 a également été déterminée.

Rapport-Gratuit.com

Comparaison des techniques RIA

L'anti-GH saumon/truite utilisé a été choisi vu la proximité phylogénétique des genres *Onchorhynchus* et *Salvelinus* (Oakley et Phillips 1999, Crespi et Fulton 2004) ainsi que son accessibilité sur le marché. Bien que les protocoles suggérés par la compagnie GroPep ont été suivis en tout temps, l'approche utilisée a été comparée au préalable avec celles présentées dans la littérature pour la mesure de la GH chez d'autres espèces. Le marquage de la GH à l'aide de chloramine-T est couramment utilisé (Bolton et al. 1986, Le Bail et al. 1991, Ayson et al. 1993). Le RIA se fait toujours à 4 °C et s'étend sur 3 jours, avec une période d'incubation avant et une autre après l'ajout du traceur (Cook et al. 1983, Wagner et McKeown 1986, Bolton et al. 1986, Le Bail et al. 1991, Ayson et al. 1993, Einarsdottir et al. 2002). Le choix d'utiliser un tampon phosphate pour le RIA ainsi que pour la réaction d'iodination a également été fait par d'autres chercheurs (Le Bail et al. 1991, Ayson et al. 1993, Einarsdottir et al. 2002). Dans le cas présent, l'utilisation du même tampon pour la réaction d'iodination ainsi que pour le RIA a été favorisée afin de maintenir la GH dans des contions stables tout au long des manipulations.

Validation du RIA

Lors des études de recouvrement, une quantité connue de GH saumon/truite a été mise en présence d'une quantité fixe de plasma d'omble de fontaine. Des concentrations de GH saumon/truite variant de 0 à 1 000 pg/200µl ont été utilisées ainsi que des dilutions successives de plasma. Ceci a permis de vérifier le pourcentage de recouvrement de la GH mesurée lors des essais et déceler la présence d'interactions non-spécifiques. Des échantillons susceptibles de contenir un fort taux de GH ont été sélectionnés, soit provenant d'individus en induction de CC ou de juvéniles en période de forte croissance somatique.

Pour fins de comparaison, des individus sexés et matures ont aussi été testés. De plus, diverses dilutions successives d'homogénats d'hypophyses ont été testées afin de vérifier s'il était possible de doser de la GH dans ces échantillons. La GH *S. fontinalis* partiellement purifiée a également été utilisée lors des dosages pour fins de validation et comparaison avec les données obtenues précédemment. L'efficacité du RIA pour le dosage de la GH *S. fontinalis* a ensuite été validée. Les pentes obtenues pour chacune des courbes ont été comparées à l'aide de l'outil fourni sur le site de l'Université de Baltimore (Arsham 2007) utilisant la méthode ANCOVA. Ceci avait pour but de valider l'hypothèse nulle selon laquelle les pentes à l'étude peuvent être considérées comme semblables. Des dilutions de PRL *S. fontinalis* variant de 250 ng/ml à 0,244 ng/ml ont également été testées en présence de l'anti-GH saumon/truite afin de vérifier si l'anticorps reconnaît la PRL. Une grande étendue de dilutions de PRL a été sélectionnée, à l'intérieur desquelles sont incluses les concentrations de GH normalement détectables. Des quantités de PRL élevées ont également été choisies afin de valider si l'anti-GH saumon/truite reconnaît ou non la PRL lorsque présente à forte concentration, alors que le potentiel pour une interaction croisée est à son plus haut.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 3 :

Reconnaissance de la GH par l'anti-GH saumon/truite

et réactivité croisée avec la PRL

La GH et la PRL ont évolué à partir d'un même polypeptide ancestral (Nicoll 1975 et 1981, Donaldson et al. 1979, Soares 2004). Malgré leur différenciation au cours de l'évolution, ces hormones partagent des similarités structurales (Donaldson et al. 1979, Nicoll 1981, Jackson et al. 2000). Cette ressemblance entre la GH et la PRL démontre le besoin de développer une méthode de mesure qui leur est spécifique notamment lors de l'utilisation d'un RIA hétérologue (Nicoll 1975). Les études menées par Pérez-Sanchez et al. (1994b) chez *Sparus aurata* et par Ricordel et al. (1995) chez *Oreochromis niloticus* démontrent néanmoins que les récepteurs pour la GH ne reconnaissent pas la PRL. Une interaction possible entre la PRL et un anticorps dirigé contre la GH ne doit cependant pas être négligée. La présente étude vise donc à confirmer la spécificité de l'anti-GH saumon/truite pour la GH *S. fontinalis*.

Reconnaissance de la GH saumon/truite par l'anti-GH correspondant

Une seule bande nette est visible lorsque la GH saumon/truite est analysée par SDS-PAGE (Fig. 3-1). La bonne reconnaissance de la GH saumon/truite par l'anticorps anti-GH saumon/truite en Western-blot a ensuite été confirmée puisqu'une bande principale apparaît sur la membrane (Fig. 3-1). La quantité d'échantillon nécessaire pour obtenir un tel résultat est faible, ce qui montre la spécificité de l'anticorps pour cet antigène. La réactivité de bandes supplémentaires, bien que faible, révèle toutefois la présence d'autres molécules réagissant avec l'anti-GH saumon/truite. Ces bandes deviennent importantes lorsqu'une concentration supérieure de GH saumon/truite est utilisée. La compagnie GroPep certifie que la GH saumon/truite est pure à 98 %.

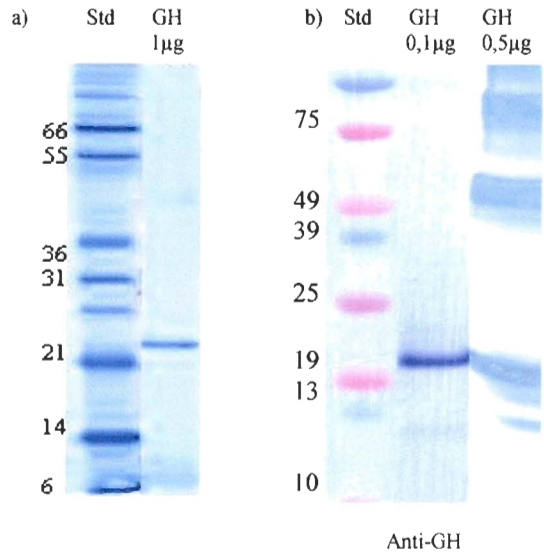

Fig. 3-1 : GH saumon/truite a) bleu de Coomassie et b) Western-blot avec l'anti-GH correspondant.

La coloration au bleu de Coomassie montre une bande nette vers 22 kDa et la bande principale révélée avec l'anti-GH saumon/truite en Western-blot apparaît vers 21 kDa (Fig. 3-1). Les valeurs calculées se rapprochent de celle théorique fournie par la compagnie, soit 21,49 kDa. Ces données valident la technique utilisée pour estimer le poids moléculaire des bandes en SDS-PAGE et Western-blot. Cette approche pourra être utilisée pour estimer le poids moléculaire des diverses bandes observées dans les échantillons à l'étude.

Présence de GH dans l'hypophyse de *S. fontinalis*

L'anti-GH saumon/truite devrait permettre de détecter la GH chez *S. fontinalis*. En effet, Oakley et Phillips (1999) ainsi que Crespi et Fulton (2004) ont démontré la proximité phylogénétique des genres *Onchorhynchus* et *Salvelinus*. Pour tester cette affirmation, des électrophorèses SDS-PAGE en condition réductrice et Western-blots ont été faites sur des homogénats d'hypophyses provenant d'ombles de fontaine et sur leurs concentrés (entre 10 et 30 kDa). Ce tissu a été choisi puisqu'il est susceptible de contenir une grande quantité de

GH. Les résultats obtenus sont regroupés à la Fig. 3-2. Tel qu'attendu, une bande principale réagissant en Western-blot a été retrouvée dans tous les extraits d'hypophyses et les concentrés testés alors que cette bande n'a pas été détectée dans les homogénats de cerveau. Ces résultats préliminaires suggèrent la présence d'une molécule d'environ 20,5 kDa réagissant avec l'anti-GH saumon/truite. Cette molécule semble être à priori la GH d'omble de fontaine. Cette bande n'est toutefois pas identifiable dans les échantillons lorsque colorés au bleu de Coomassie, ce qui laisse croire que la GH serait présente en faible proportion comparativement aux autres molécules.

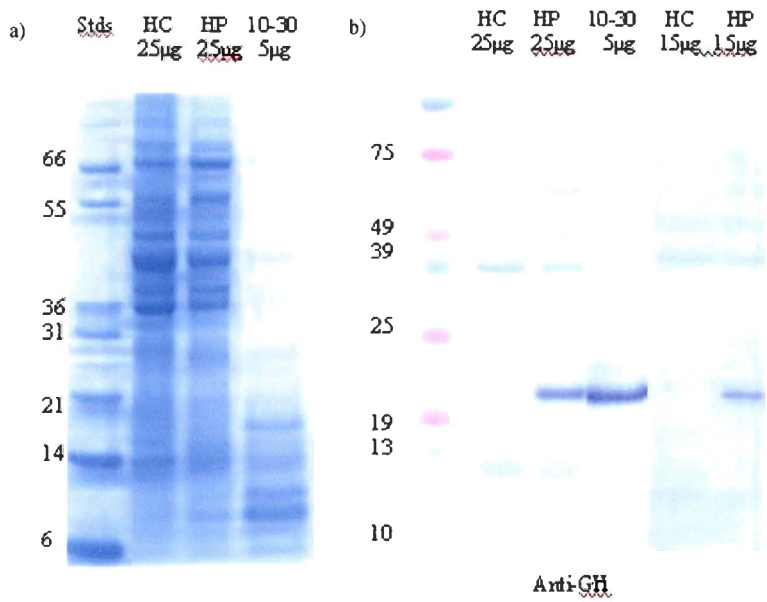

Fig. 3-2 : a) Électrophorèses SDS-PAGE et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite faits sur homogénat de cerveau (HC), homogénat d'hypophyses (HP) et concentré d'homogénat (10-30kDa).

Interactions croisées anti-PRL et PRL *S. fontinalis*

Les interactions croisées entre la GH, la PRL et leurs anticorps respectifs ont été testées afin de confirmer la reconnaissance des antigènes par l'anticorps approprié. La bonne reconnaissance de la PRL recombinante *S. fontinalis* par l'anti-PRL correspondant a

d'abord été vérifiée. Les résultats obtenus montrent que cet anticorps reconnaît l'antigène pour lequel il a été développé (Fig. 3-3) et suggère la validité de son utilisation pour reconnaître la PRL présente dans nos échantillons.

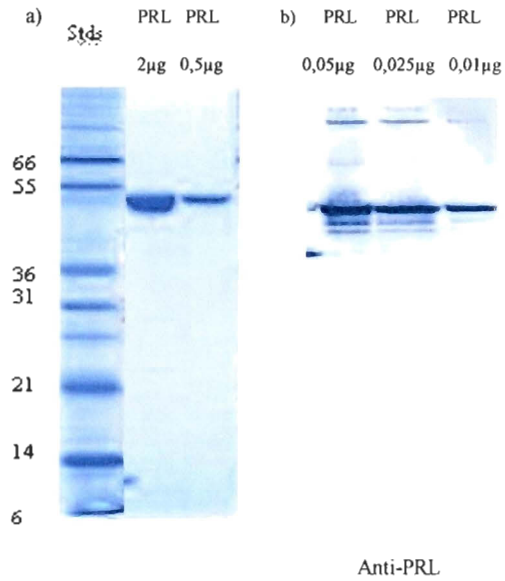

Fig. 3-3 : PRL recombinante a) bleu de Coomassie et b) Western-blot avec anti-PRL.

Des échantillons d'homogénats d'hypophyses et de concentrés d'homogénats (10-30 kDa) ont été analysés avec cet anti-PRL. Les résultats montrent qu'une bande principale réagit en Western-blot (Fig. 3-4). Le poids moléculaire moyen est de 20 kDa et pourrait représenter la PRL *S. fontinalis*. Les masses moléculaires estimées par Mbow (1999) pour la PRL de cette espèce varient entre 22 et 24 kDa. La valeur obtenue dans notre étude se rapproche plutôt de celle estimée pour la GH *S. fontinalis* observée en Western-blot, soit 20,5-21 kDa. Il n'est toutefois pas exclu que ces bandes représentent deux protéines distinctes aux poids moléculaires rapprochés.

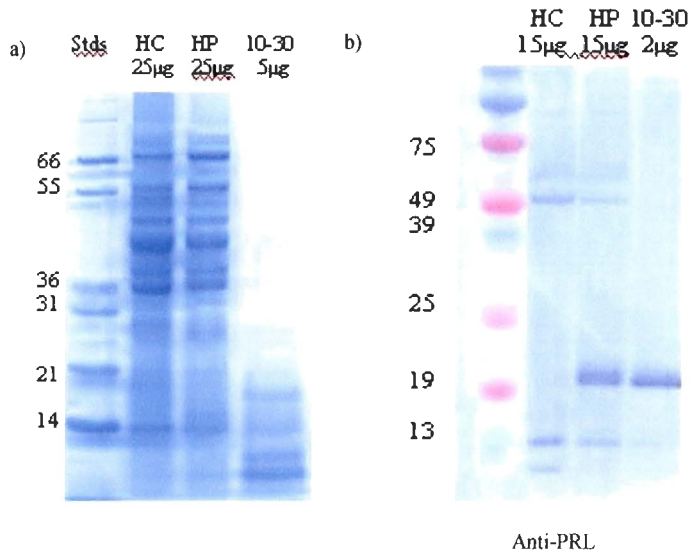

Fig. 3-4 : PRL a) bleu de Coomassie et b) Western-blot avec anti-PRL, dans des homogénat de cerveau (HC), homogénat d'hypophyses (HP) et concentré d'homogénat (10-30kDa).

D'autres tests similaires ont confirmé la non réactivité de l'anti-PRL *S. fontinalis* avec la GH saumon/truite, même lorsque présente à 0,5 µg (Fig. 3-5). En comparaison, une forte réaction est observée avec l'anti-GH en présence de 0,1 µg de GH saumon/truite. Tel que démontré au chapitre 2, la spécificité des anticorps laisse croire que le matériel détecté est bien celui visé. À l'inverse, l'anti-GH saumon/truite ne reconnait pas la PRL recombinante *S. fontinalis* (Fig. 3-6). Les bandes observées ne correspondent pas à la bande principale de la PRL recombinante (Fig. 3-3). Dans les échantillons à l'étude, on peut affirmer que la liaison entre la GH et l'anti-GH sera favorisée au détriment d'une interaction possible entre l'anti-GH et la PRL.

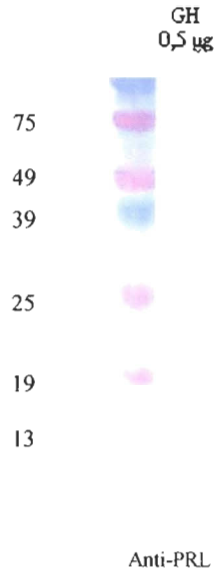

Fig. 3-5 : Reconnaissance de la GH saumon/truite par l'anti-PRL *S. fontinalis.*

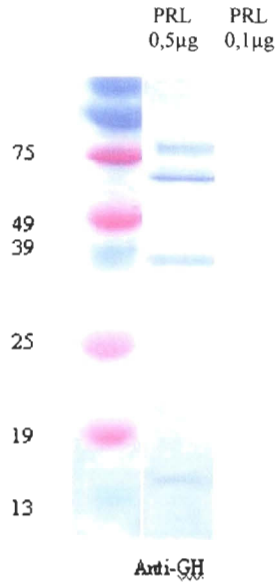

Fig. 3-6 : Reconnaissance de la PRL recombinante *S. fontinalis* par l'anti-GH saumon/truite.

En somme, les anticorps réagissent adéquatement avec les antigènes recombinants pour lesquels ils ont été développés. Le tableau 3-1 résume les résultats. Seules les réactions correspondant aux bandes respectives de GH ou PRL sont considérées. Les divers

contrôles effectués ont permis de confirmer que ces anticorps sont suffisamment spécifiques et que le degré de réactivité croisée est faible ou nul. L'anti-GH saumon/truite peut donc être utilisé avec efficacité dans la reconnaissance de la GH *S. fontinalis*, sans soucis d'interaction croisée avec la PRL aux concentrations testées.

Réaction avec la/les bandes principales	Anti-PRL (polyclonaux)	Anti-GH saumon/truite
PRL Recombinante	+++++	0
Homogénat Pituitaires	+	++++
Concentré 10-30 kDa	++	++++
Fractions FPLC	+++	++++
GH saumon/truite	0	+++++
Homogénat cerveau	0	0

Tableau 3-1 : Degré de réaction observé en western-blot, avec anti-GH saumon/truite et anti-PRL *S. fontinalis,* sur les échantillons testés.

Réactivité croisée anti-GH saumon/truite et PRL *S. fontinalis* en RIA

Des RIA utilisant la PRL *S. fontinalis* ont été effectués afin de confirmer les données obtenues quant à la spécificité de l'anti-GH saumon/truite pour reconnaître la GH *S. fontinalis*. La technique RIA étant beaucoup plus sensible, elle permet de confirmer si cet anti-GH reconnaît ou non la PRL. Les données obtenues ont permis de démontrer qu'aucune réactivité croisée avec la PRL *S. fontinalis* n'a lieu, malgré sa similarité avec la GH (Fig. 3-7). Aucun matériel n'a pu être dosé entre 0,244 ng/ml et 250 ng/ml de PRL. En

Rapport-Gratuit.com

comparaison, la PRL est présente à des concentrations variant de 3,20 ng/ml à 55,73 ng/ml chez deux espèces de tilapia (Ayson et al. 1993).

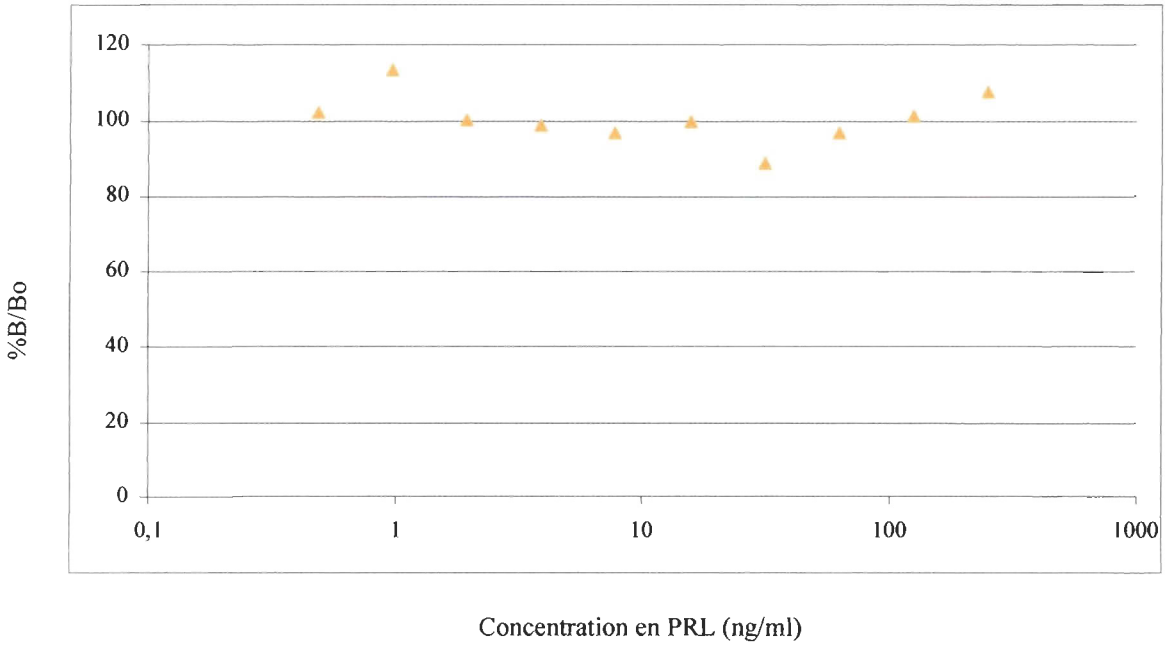

Fig. 3-7: Dosage de la PRL avec RIA hétérologue utilisant l'anti-GH saumon/truite.

Ces données confirment que lors des essais utilisant l'anti-GH saumon/truite pour la détection de la GH *S. fontinalis*, le matériel dosé est bien celui visé. L'utilisation de cet anticorps est donc valable pour l'étude de la GH *S. fontinalis,* pour la reconnaître et pour l'isoler lors du processus de purification.

Chapitre 4 :

Purification et caractérisation partielle de la GH *S. fontinalis*

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

La GH est importante dans divers processus biologiques, notamment dans la croissance chez les poissons. L'information disponible quant à ses modes d'action et les facteurs l'influençant demeure cependant incomplète ou contradictoire. Aucune étude de la GH chez *S. fontinalis* n'a été faite auparavant, malgré l'importance économique de cette espèce. Dans le cas présent, la présence de GH dans l'hypophyse de *S. fontinalis* a été démontrée, puis une technique pour partiellement l'isoler a été mise au point. Cette étude est la première à détailler un tel processus pour la GH de cette espèce. Cette GH partiellement purifiée de *S. fontinalis* a ensuite permis de tester l'efficacité du RIA hétérologue développé.

Confirmation de la présence de GH dans l'hypophyse de *S. fontinalis*

L'anti-GH saumon/truite peut être utilisé pour la reconnaissance de la GH *S. fontinalis*. Des RIA ont été fait sur des homogénats d'hypophyses pour fins de validation. Tel qu'attendu, la technique développée a permis de doser de la GH dans les échantillons testés alors qu'aucune GH n'a été détectée dans le contrôle négatif, soit les homogénats de cerveau. Ces données attestent la présence de GH dans l'hypophyse, tel que démontré chez d'autres vertébrés. Avec l'amélioration des techniques, une plus grande proportion de GH a pu être détectée. Notamment, la mise en œuvre d'approches pour limiter la dégradation et/ ou l'agrégation des protéines a été favorisée puisque ces phénomènes provoquent la perte de matériel. Dans cette étude, il a été démontré que l'ajout de manipulations lors des filtrations a provoqué une perte importante de GH. Les homogénats testés en RIA, ayant subi une filtration 10-30 kDa ont démontré une perte considérable du matériel dosé lors des essais (Tableau 4-1).

Réplicats	GH estimée (ng/ml)	GH estimée (ng/ml)	GH estimée (ng/ml)	GH estimée (ng/ml)
1	561	125	115	34
2	655	148	141	53
3	733	203	162	62
4	768	192	175	73
5	892	235	221	60
Moyenne :	**722**	**181**	**163**	**56**

Tableau 4-1: Dosages en RIA avec anti-GH saumon/truite d'homogénats d'hypophyses *S. fontinalis* (P1 et P2) et concentrés 10-30kDa de ces homogénats.

Purification de la GH *S. fontinalis* sur colonne FPLC

Des préparations d'homogénats d'hypophyses ont été soumis à un tamisage moléculaire afin d'isoler la GH d'omble de fontaine (Fig. 4-1). Les fractions de chacun des pics (ou déformation du bruit de fond) ont été combinées pour analyses sur gel SDS-PAGE en condition dénaturante, puis passées en Western-blot avec anti-GH saumon/truite (Fig. 4-2). Parmi ces échantillons testés, celui comportant les fractions allant de 33 à 45 ml contient de la GH. Malgré l'absence de pics suivant ces volumes, une grande proportion de GH a été détectée vers 72 ml. Ce volume d'élution correspond au poids moléculaire estimé pour la GH monomérique d'omble de fontaine, soit 20,5 kDa. Les pics visibles sur le chromatogramme contiennent certes de la GH, mais majoritairement d'autres molécules. Ceci est bien visible sur l'électrophorèse des trois premiers pics alors que la bande de GH n'est pas visible. L'absence de pic sur le chromatogramme, là ou se situe la plus grande quantité de GH monomérique, proviendrait de la faible concentration de protéines totales à cet endroit. Le gel d'électrophorèse confirme bien la plus grande proportion de GH présente, comparativement aux autres fractions analysées, alors que la bande apparaît sur le

gel et que le degré de réactivité avec l'anticorps y est le plus fort pour un même volume d'échantillon. La présence de dimères, autres oligomères, ainsi que la liaison de la GH avec diverses molécules peut donc expliquer la détection positive de GH à l'intérieur des fractions de haut poids moléculaire. La GH détectée par Western-blot suite à l'électrophorèse SDS-PAGE en condition dénaturante, est présente vers 20 kDa tel qu'attendu. Aucune autre bande ne réagit avec l'anticorps utilisé. Dans les autres études similaires présentes dans la littérature, seules les fractions correspondant à des pics semblent avoir été analysées. C'est ce que précisent Rand-Weaver et al. (1989) dans leur article alors que les fractions correspondantes à des volumes d'élution supérieurs n'ont pas été testées. La présence de GH ailleurs que dans ces pics n'a pas été vérifiée.

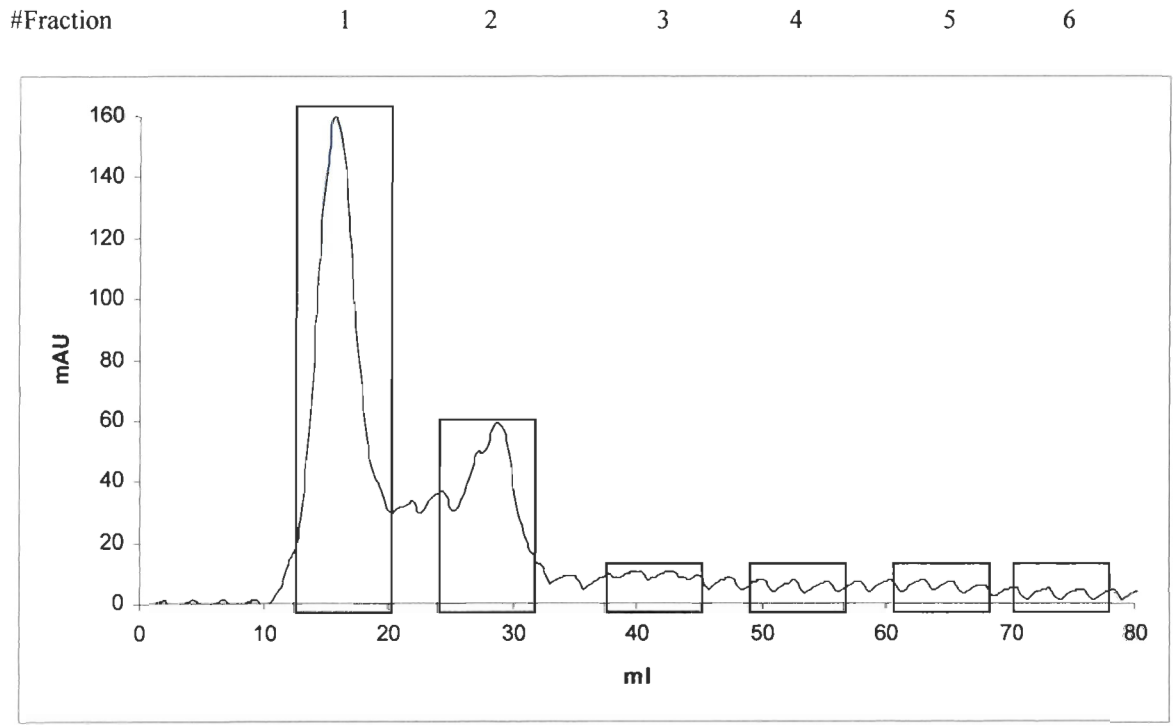

Fig. 4-1 : Tamisage moléculaire d'extrait d'hypophyses sur gel Sephadex G-75 (colonne 1,6 x 90 cm) avec tampon 0,05 M ammonium acétate pH 9,0.

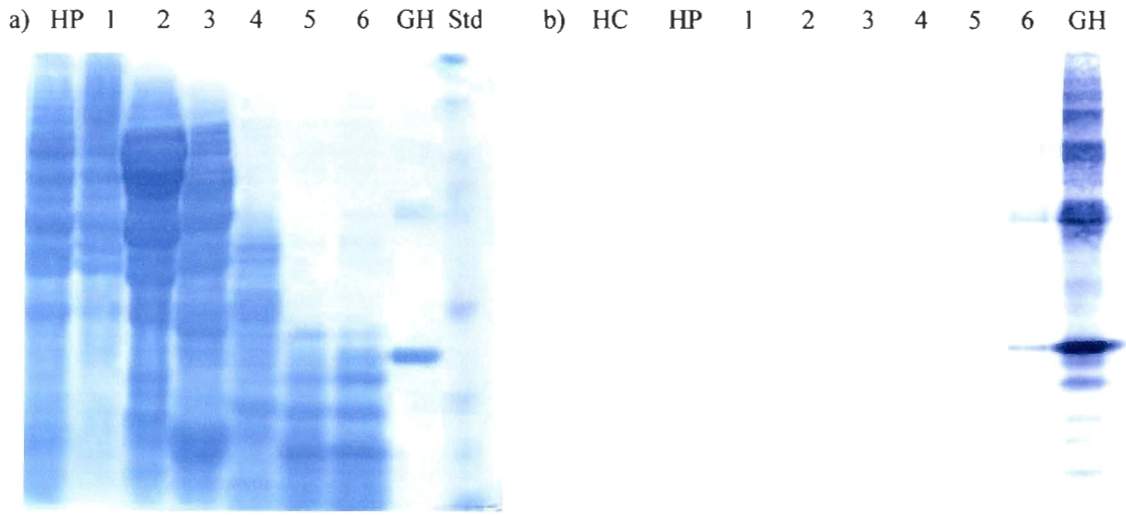

Fig. 4-2 : a) SDS-PAGE et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite sur fractions (#1 à 6), homogénat d'hypophyses (HP), GH saumon/truite (GH) et homogénat de cerveau (HC) suivant l'élution de la Fig. 4-1.

Évaluation d'autres approches et mise au point de la technique

Un test avec 500 hypophyses a été fait afin de palier à l'absence de pic de GH sur le chromatogramme. Celles-ci ont été homogénéisées et concentrées entre 10 et 30 kDa dans le but de concentrer la quantité de GH et limiter les risques d'interférence provenant des molécules, présentes en grande quantité dans l'échantillon. Ceci n'a toutefois pas permis d'obtenir un pic de GH malgré l'utilisation de 2,5 fois plus de matériel. Une électrophorèse et Western-blot sur les fractions recueillies confirment la présence de GH suite au tamisage moléculaire bien que l'hormone soit présente en moins grande quantité. Une autre série d'environ 500 hypophyses a été homogénéisée puis le surnageant a été passé sur filtres Amicon-Ultra 10 kDa afin de réduire le volume d'échantillon à déposer sur la colonne. Un meilleur recouvrement de la GH a été obtenu avec cette approche. Le chromatogramme n'a pas montré la présence d'un pic de GH aux volumes d'élutions attendus, mais la concentration de GH monomérique était plus grande dans les fractions prévues. Des tests ont également été faits en comparant les prélèvements d'hypophyses sur têtes congelées à

ceux sur des ombles de fontaine frais. L'utilisation d'un même nombre d'hypophyses, prélevées sur des truites fraîches, permet de récupérer une plus grande quantité de GH après le tamisage moléculaire. D'autres tests utilisant des homogénats d'hypophyses frais et des homogénats congelés suivant leur préparation ont été faits. La congélation des échantillons, à cette étape, a provoqué une forte précipitation et la perte subséquente de GH. L'approche qui a démontré le meilleur rendement pour l'isolation de la GH *S. fontinalis* est l'utilisation d'hypophyses provenant de têtes fraîches. Les hypophyses doivent ensuite être congelées dès l'extraction. Lors du processus d'homogénéisation, la température des échantillons doit être maintenue à 4 °C et l'agitation trop forte des solutions qui augmente le contact avec l'air doit être limité. L'application de l'homogénat sur la colonne immédiatement après sa préparation donne également les meilleurs résultats (Fig. 4-3).

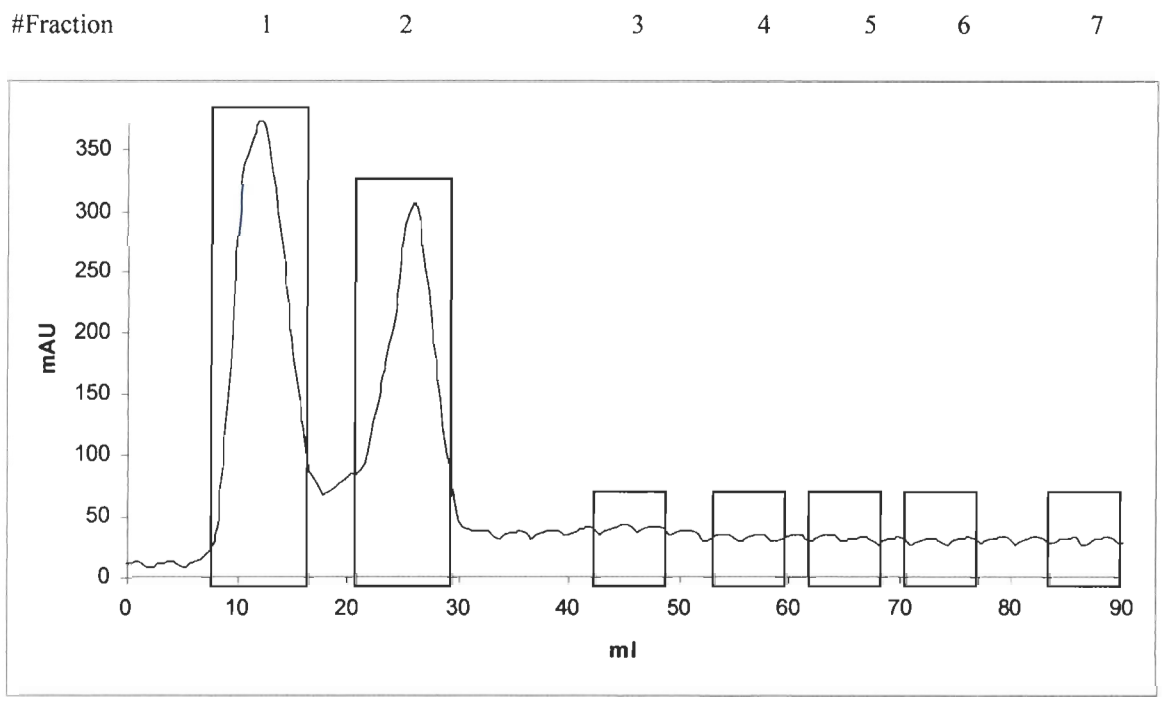

Fig. 4-3 : Tamisage moléculaire d'extrait d'hypophyses sur gel Sephadex G-75 (colonne 1,6 x 90 cm) avec tampon 0,05 M ammonium acétate pH 9,0.

Aucun pic de GH n'a été visible sur le chromatogramme. Les études en électrophorèse sur gels SDS-PAGE et en Western-blot avec anti-GH saumon/truites ont toutefois confirmé la présence de GH en plus forte concentration dans ces fractions (Fig. 4-4). Une quantité moindre d'échantillon a été utilisée pour les électrophorèses lors de cet essai. La GH présente est de loin supérieure à toute observation antérieure faite dans ce projet, ce qui montre l'efficacité de l'approche utilisée. La plus grande quantité de GH dans ces échantillons révèle la présence de deux isoformes, autrement impossible à détecter dans les tests précédents. Les bandes de GH sont nettement visibles sur le gel coloré au bleu de Coomassie. La méthode de purification décrite permet de recueillir avec efficacité la GH en provenance de l'hypophyse chez *S. fontinalis.* Cette GH partiellement purifiée présente un grand intérêt pour l'étude de cette hormone chez l'omble de fontaine.

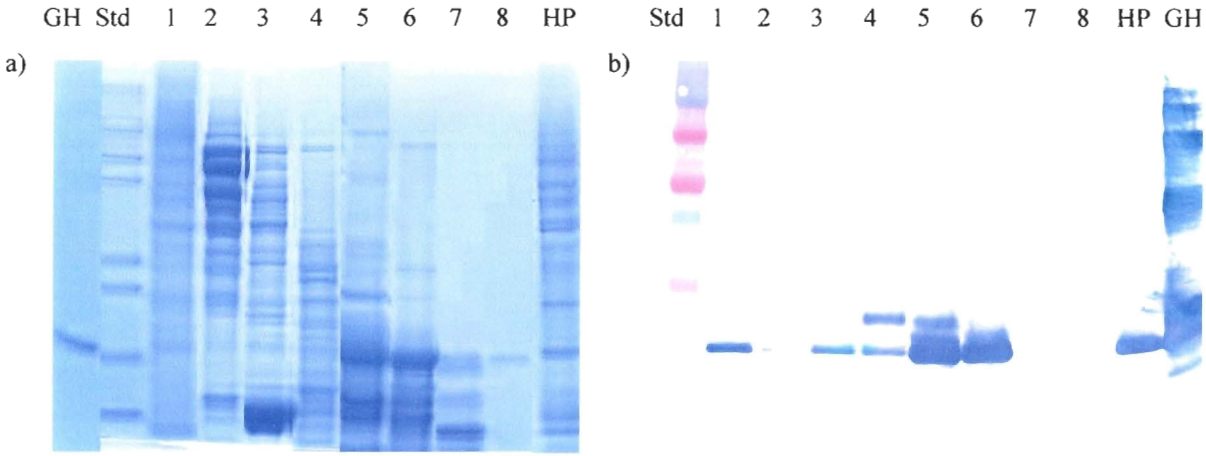

Fig. 4-4 : a) SDS-PAGE et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite sur fractions (#1 à 8), homogénat d'hypophyses (HP), GH saumon/truite (GH) et standard (Std) suivant l'élution de la Fig. 4-3.

Étude et caractérisation de la GH *S. fontinalis*

Divers homogénats d'hypophyses ont été testés, ainsi que des fractions obtenues suivant le tamisage moléculaire sur FPLC. Suivant des électrophorèses SDS-PAGE en

condition réductrice, une bande nette a réagi en Western-blot avec l'anti-GH saumon/truite (Fig. 4-1 et 4-2). Pour fins de comparaisons, la quantité de protéines utilisée est la même pour les homogénats d'hypophyses. Ces résultats suggèrent la présence d'une molécule d'environ 20,5-21 kDa réagissant avec l'anti-GH, soit la GH d'omble de fontaine. Cette bande n'est pas clairement identifiable dans les échantillons d'hypophyses lorsque colorés au bleu de Coomassie et laisse croire que la GH est présente en faible proportion comparativement aux autres protéines. Des gels SDS-PAGE avec et sans agent réducteur (dithiothreitol) ont ensuite été comparés. Le SDS brise les liens hydrogènes, prévient les interactions hydrophobiques et défait la structure secondaire des polypeptides sans briser les liens covalents. L'utilisation d'agent réducteur permet le déploiement complet des molécules en brisant les ponts disulfures. La comparaison de ces électrophorèses sur gels SDS-PAGE permet de déterminer si des dimères ou autres polymères sont présents et le cas échéant, s'ils sont formés par des ponts disulfures.

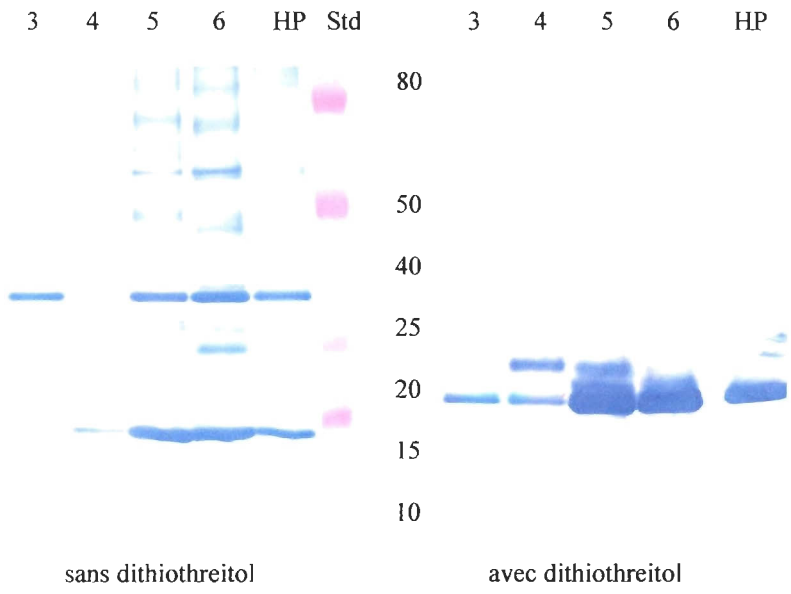

Fig. 4-5 : Western-blot avec anti-GH saumon/truite, suivant des gels SDS-PAGE Bis-tris 4-12% avec et sans agent réducteur.

Les résultats montrent une bande principale réagissant avec l'anti-GH saumon/truite. Cette bande ne possède pas le même poids moléculaire avec et sans agent réducteur (Fig. 4-5). Les deux bandes de GH principales sont de 31 et 18 kDa sans agent réducteur, comparativement à 20 et 22 kDa avec agent réducteur. Ces bandes représentent vraissemblablement deux isoformes de GH. Dans la littérature, des chercheurs ont en effet observé deux formes de GH chez plusieurs espèces de poissons (Le Bail et al. 1989, Sekine et al. 1989, Björnsson 1997, Oakley et Phillips 1999, McKay et al. 2004). Chez *Gadus morhua*, la GH possèdent des poids moléculaires estimés de 20 et 22 kDa (Rand-Weaver et al. 1989 et 1991), qui correspondent aux bandes observées chez *S. fontinalis* avec agent réducteur. La bande obtenue vers 31 kDa sans agent réducteur pourrait provenir de liaisons disulfures entre la GH et d'autres molécules. Wood (2001) a observé un poids moléculaire de GH supérieur alors que celle-ci était liée à 1 ou 2 protéines de liaisons (GHBP). De plus, l'utilisation de SDS sans agent réducteur permet de conserver la structure quaternaire des molécules. Ce phénomène peut expliquer la bande présente vers 31 kDa, alors que la GH migre plus lentement vu sa conformation.

L'étude d'échantillons contenants de la GH *S. fontinalis* a ensuite été faite sur gel d'électrophorèse Native-PAGE. Cette approche permet de détecter la présence possible de formes dimériques ou autres contenant de la GH, autrement scindées en SDS-PAGE. L'analyse sur gel Native-PAGE a aussi été faite en présence d'agent réducteur, afin de comparer son effet sur les molécules de GH présentes. L'approche est semblable à celle utilisée en SDS-PAGE, afin de vérifier la présence de ponts disulfides dans les composés contenant la GH. Les volumes d'échantillons utilisés sont les mêmes, afin de rendre plus aisées les comparaisons entre les gels. Les gels obtenus ont permis de détecter la présence

Rapport-Gratuit.com

de bandes réagissant en Western-blot avec l'anti-GH saumon/truite (Fig. 4-6). Il n'est pas possible de déterminer avec précision le poids moléculaire de ces bandes. Cependant, ces gels montrent bien la présence de composés de haut poids moléculaire réagissant avec l'anti-GH. Il est probable que ces composés soient formés par des liens hydrogène, liaisons ioniques ou des interactions hydrophobiques. Ces composés ne sont pas visibles sur les gels SDS-PAGE puisque le SDS annule ces interactions. Ceci confirme que la GH observée en SDS-PAGE, visible vers 20 kDa dans les premières fractions d'élution obtenues au FPLC, provient de molécules de haut poids moléculaire. Les bandes observées suivant les Native-PAGE avec et sans agent réducteur n'ont pas le même poids moléculaire (Fig 4-6 et 4-7), tel que vu en SDS-PAGE. Les bandes principales réagissant avec l'anti-GH possèdent un poids moléculaire inférieur en présence de l'agent réducteur puisque le dithiothreitol brise les ponts disulfures, modifie la structure et influence le poids moléculaires des molécules.

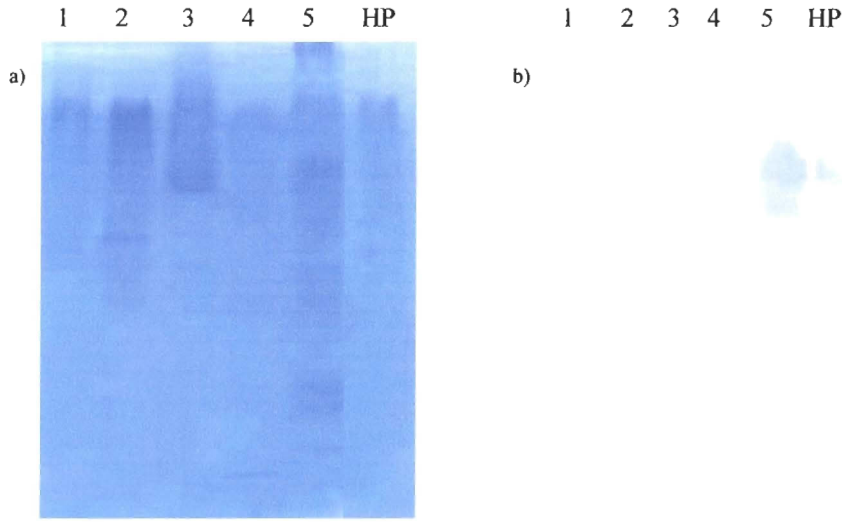

Fig. 4-6 : a) Coloration bleu Coomassie et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite, suivant électrophorèse sur gel Tris-Gly 4-20%.

a) 1 2 3 4 5 HP b) 2 3 4 5 HP

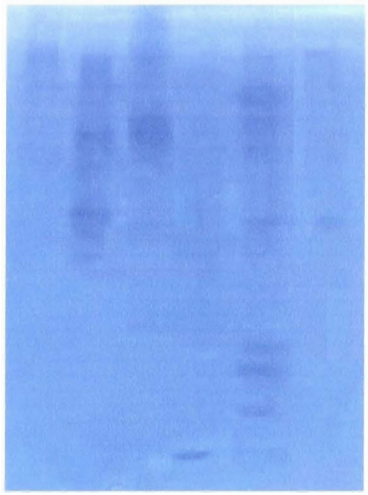

Fig. 4-7 : a) Coloration bleu Coomassie et b) Western-blot avec anti-GH saumon/truite, suivant électrophorèse sur gel Tris-Gly 4-20% avec d'agent réducteur.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Chapitre 5 :

Développement et validation d'un RIA hétérologue afin de mesurer la GH chez *S. fontinalis*

La GH est le principal régulateur de la croissance somatique chez les vertébrés. Il est primordial de comprendre ses modes d'action afin d'en tirer avantage. Pour ce faire, le développement de méthodes de dosage fiables pour cette hormone est nécessaire. Les RIA représentent une technique de choix puisque sensibles, précis et faciles d'utilisation (Nicoll 1975, Peake et al. 1979, Lauritzen et al. 1994). Le développement d'un RIA homologue demande préalablement la purification de la GH pour l'espèce visée. C'est pourquoi le développement d'un RIA hétérologue présente une alternative avantageuse pour les espèces dont la GH n'a pas été purifiée. Cette étude a permis de développer et valider un RIA hétérologue pour la mesure de la GH chez *S. fontinalis*, espèce important en aquaculture au Québec. La technique utilise la GH et l'anti-GH de saumon/truite disponible sur le marché, sélectionnée à cause de la proximité phylogénétique des espèces (Oakley et Phillips 1999, Crespi et Fulton 2004).

Validation de la stabilité du traceur

Le traceur utilisé est GH saumon/truite marquée à l'I^{125}. Celui-ci a donné de bons résultats même au-delà du 4 semaines de conservation suggéré par la compagnie GroPep. Malgré une perte de l'activité radioactive et le besoin d'ajouter une plus grande quantité de traceur, aucun changement majeur dans les courbes standard GH saumon/truite n'a été détecté (Fig. 5-1) en plus d'aucune perte de sensibilité et d'efficacité. L'écart type pour chacun des points de la courbe, toutes valeurs confondues, varie de 0,1 à 2,5 %B/Bo.

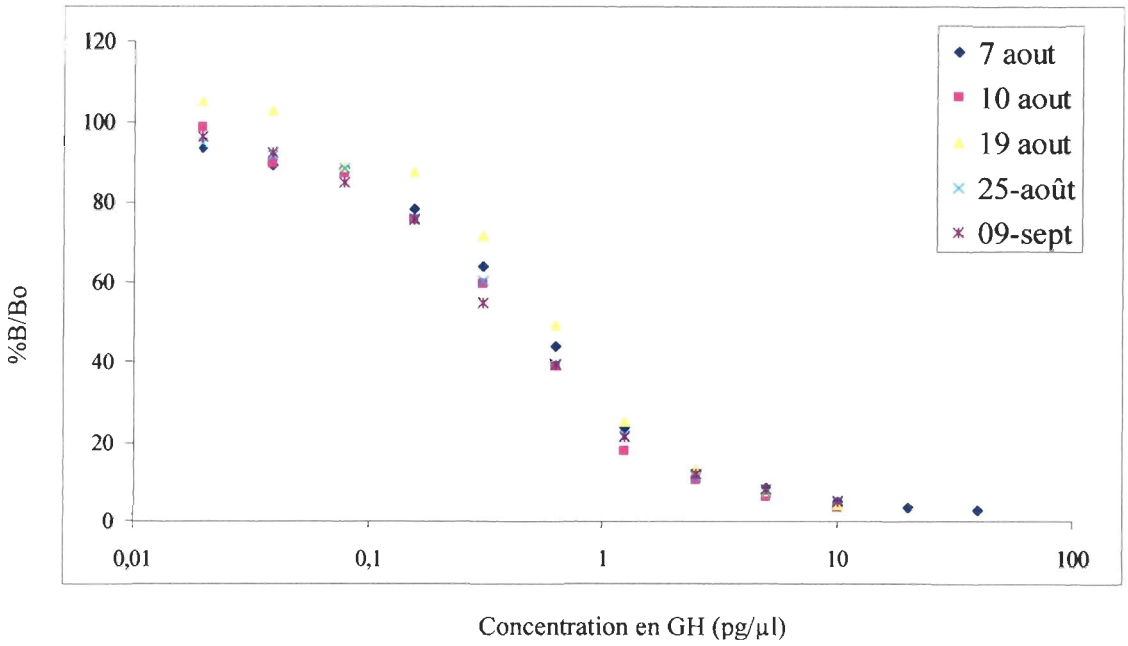

Fig. 5-1 : Courbes standard de GH saumon/truite pendant la durée des expérimentations, du marquage jusqu'à 6 semaines. Le marquage a eu lieu le 27 juillet.

Étude de recouvrement de la GH saumon/truite

Des études de recouvrement utilisant du plasma d'omble de fontaine ont été réalisées afin de vérifier le pourcentage de la GH saumon/truite mesuré lors de l'essai et déceler la présence d'interactions non-spécifiques. Les pourcentages de recouvrement obtenus se situent entre 72,5% et 87,9% (Tableau 5-1). Les valeurs montrent la bonne reconnaissance de la GH saumon/truite à l'aide de cet essai et un degré d'interaction non-spécifique acceptable. Le recouvrement de la GH observé dans cette étude (Fig. 5-2) est semblable à celui présent dans la littérature. La pente de la courbe de régression est de 0,98 ce qui est acceptable. Le Bail et al. (1991) ont obtenu une pente de 1,03 lors de l'utilisation d'un RIA chez *O. tshawytscha* alors que Bolton et al. (1986) ont observé une pente de 0,969 en utilisant un RIA chez *O. keta*. L'ensemble des données provenant des études de recouvrement effectuées ont été combinées pour le calcul de la pente de régression.

Concentration GH (pg/200µl)	Dilution plasma	%B/Bo	Concentration mesurée (pg/ µl)	Concentration attendue (pg/ µl)	% de recouvrement	Moyenne
250	1/2	59,0	1,10	1,3	88,2	**87,6**
125	1/2	76,9	0,54	0,63	87,0	
250	1/16	62,9	0,95	1,3	75,7	**72,5**
125	1/16	82,7	0,43	0,63	69,2	

Concentration GH (pg/200µl)	Dilution plasma	%B/Bo	Concentration mesurée (pg/ µl)	Concentration attendue (pg/ µl)	% de recouvrement	Moyenne
1000	1/2	30,4	4,92	5,0	98,5	**87,9**
500	1/2	52,4	2,25	2,5	90,0	
250	1/2	76,8	0,94	1,3	75,4	
1000	1/8	32,6	4,54	5,0	90,9	**73,7**
500	1/8	61,9	1,60	2,5	64,1	
250	1/8	80,5	0,83	1,3	66,1	

Tableau 5-1 : Étude de recouvrement à partir de plasma d'ombles de fontaine.

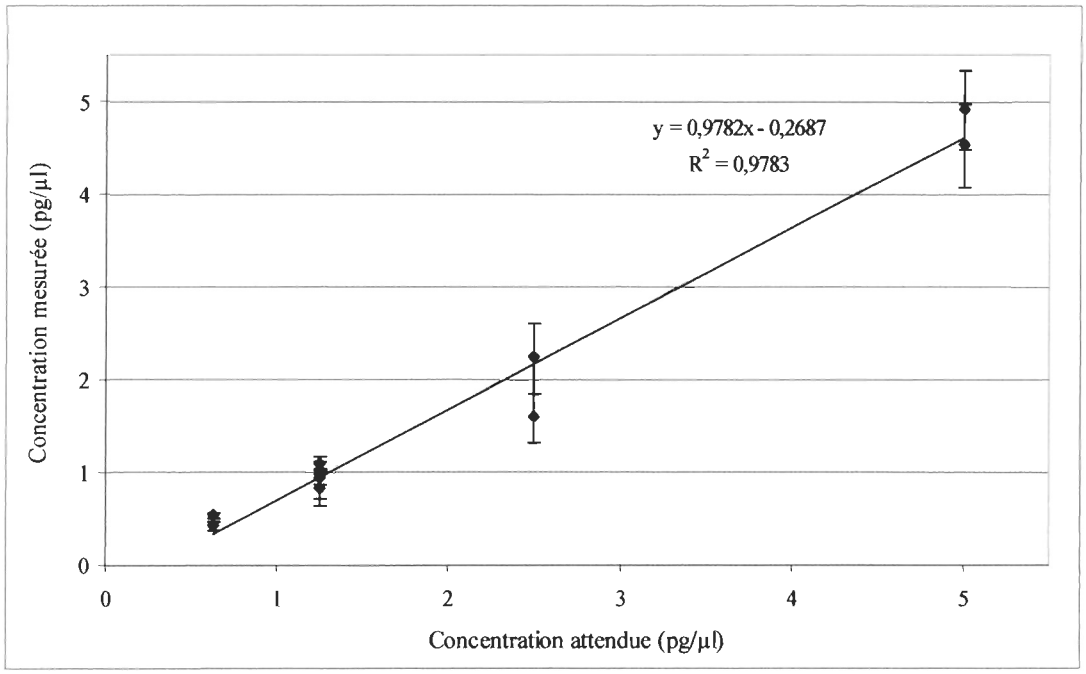

Fig. 5-2 : Recouvrement de GH saumon/truite en présence de plasma *S. fontinalis* à dilution 1/2, 1/8 ou 1/16.

Limites de détection

Le RIA utilisé semble reconnaître la GH saumon/truite à l'intérieur des limites prévues. Les limites de détection obtenues ont varié de 0,06 à 0,15ng/ml pour le ED90 tout au long des RIA. Le ED50 se situe quant à lui entre 0,32 à 0,61ng/ml (Tableaux 5-2 et 5-3). Ces valeurs sont inférieures à celles suggérées par GroPep, qui suggère un ED50 de 1,0ng/ml suivant leur protocole d'iodination. Les valeurs obtenues concordent avec celles de Ricordel et al. (1995) qui ont observé un ED90 de 0,08ng/ml et un ED50 de 0,62 ng/ml en mesurant la GH chez *Oreochromis niloticus*. En comparaison, les valeurs de la présente étude sont inférieures à celles obtenues en utilisant un RIA homologue chez *Sparus aurata*, avec des valeurs ED50 de 2,5 ng/ml et 3,1 ng/ml respectivement (Le Bail et al. 1993, Pérez-Sanchez et al. 1994a) ou un RIA hétérologue chez *Salmo salar* avec un ED50 de 2,2 ng/ml (Björnsson et al. 1994) et chez *S. alpinus* avec un ED80 de 0,5 ng/ml (Jorgensen et al. 2007). Les valeurs de ED50 observées pour *O. tshawytscha* sont également plus élevées, allant de 1,5ng/ml à 2 ng/ml (Le Bail et al. 1991). La compagnie GroPep note que leur RIA pour la GH saumon/truite permet de doser des valeurs jusqu'à 0,045ng/ml.

	1er marquage							2eme marquage		
***blanc soustrait**	**7 aout**	**10 aout**	**19 aout**	**25 aout**	**9 sept.**	**15 sept.**	**22 sept.**	**1 nov.**	**27 nov.**	**6 dec.**
Blanc (cpm)	389	373	291	216	368	369	541	825	729	724
Zero* (cpm)	7317	6293	4844	5381	4737	4209	3328	4593	2668	1360
Total* (cpm)	20000	19459	16753	19211	21209	20333	18178	19924	18198	19761
% (B_0/T)	37	32	29	28	22	21	18	23	15	7
ED90 (ng/ml)	0,10	0,08	0,15	0,08	0,08	0,07	0,09	0,12	0,12	0,06
ED80 (ng/ml)	0,15	0,12	0,21	0,12	0,12	0,10	0,14	0,18	0,18	0,09
ED50 (ng/ml)	0,50	0,39	0,61	0,41	0,40	0,33	0,43	0,55	0,54	0,32
ED20 (ng/ml)	1,68	1,29	1,78	1,46	1,33	1,05	1,37	1,69	1,67	1,06

Tableau 5-2 : Limites de détection des RIA et valeurs pour le blanc, zero et total.

Moyenne **ED 90** : 0,09 ng/ml	Intervalle **ED 90** : de 0,06 ng/ml à 0,15 ng/ml
Moyenne **ED 80** : 0,13 ng/ml	Intervalle **ED 80** : de 0,09 ng/ml à 0,21 ng/ml
Moyenne **ED 50** : 0,45 ng/ml	Intervalle **ED 50** : de 0,32 ng/ml à 0,61 ng/ml
Moyenne **ED 20** : 1,30 ng/ml	Intervalle **ED 20** : de 1,05 ng/ml à 1,78 ng/ml
ED 50 établi selon **GroPep** : 1,0 ng/ml pour la GH de saumon/truite	

Tableau 5-3 : Compilation des limites de détection des RIA.

Dosage de la GH *S. fontinalis*

Des échantillons de plasma *S. fontinalis* de diverses provenances ont été testés afin de valider l'utilisation du RIA pour cette espèce. Des études préliminaires ont été faites en utilisant des échantillons susceptibles de contenir un fort taux de GH, soit des échantillons en provenance d'expériences d'induction de CC ou de juvéniles en période de forte croissance somatique. Pour fins de comparaison, des individus sexés et matures ont également été testés. Le plasma a été testé à dilutions successives de 1/1 à 1/8. Sur les neuf échantillons de plasma sélectionnés de l'expérience de CC, cinq ont donné des résultats à l'intérieur des limites de détection du RIA avec des concentrations en GH estimés de 0,9 ng/ml à 3,3 ng/ml. L'hypothèse initiale suggérait la présence élevée de GH chez ces individus, pour lesquels l'induction d'un phénomène de CC a été confirmée (Fig. 5-3).

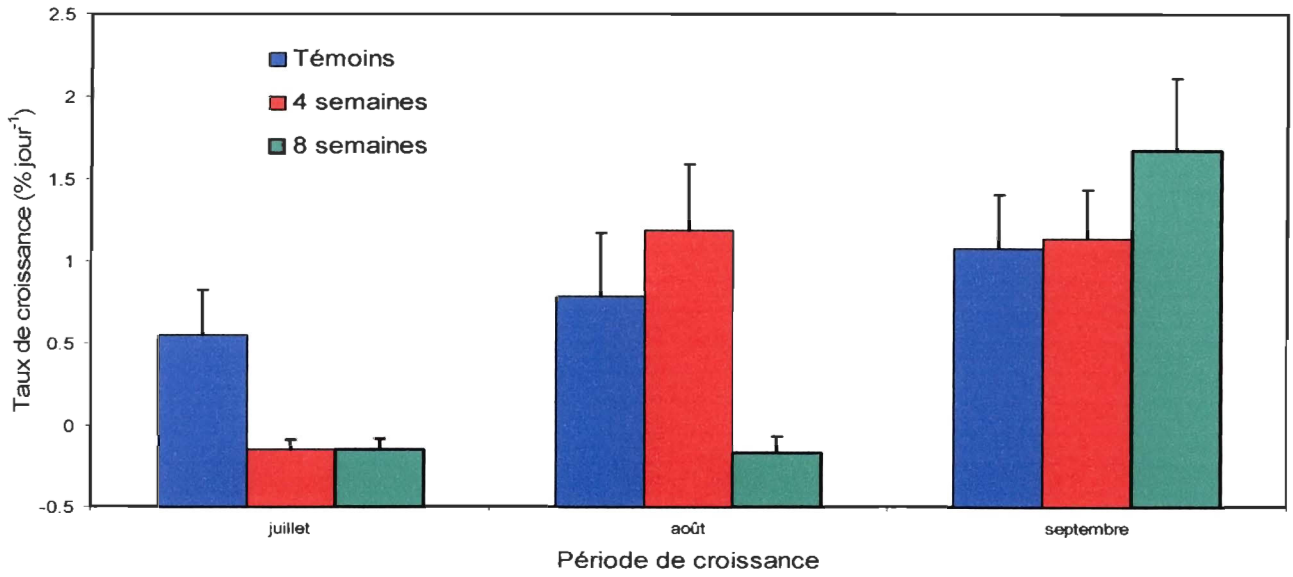

Fig. 5-3 : Induction de CC chez des individus en restriction alimentaire (Le François, communication personnelle).

Afin de poursuivre l'étude, des échantillons provenant d'individus immatures, femelles ou mâles ont été testés. Il a été impossible de doser la GH chez l'ensemble des individus testés (n=5) provenant de la pisciculture de St-Anaclet (2005) alors que toutes les valeurs sont en dehors des limites de détection. La longueur moyenne des poissons se situait vers 20,3 cm (n=12). Des échantillons de plasma provenant d'ombles de taille comparable achetés dans cette même pisciculture, en 2006, ont également été testés selon les mêmes procédures. Il a alors été possible de doser de la GH chez tous les individus testés (n=5) avec des taux de GH estimés variant de 0,5 à 3,2 ng/ml. Une dernière série d'expérience a été faite avec des ombles de taille inférieure, en provenance de la pisciculture de Dégelis. La longueur moyenne des ombles mesurés était de 15,5 cm (n=15). Sur quatre échantillons testés, un a pu être dosé à 0,5 ng/ml alors que les trois autres étaient en dehors des limites de détection.

Sur un total global de 23 échantillons de plasma testés, il a été possible de doser de la GH *S. fontinalis* dans moins de 50% des cas. Les résultats provenant des dosages effectués sur plasma d'ombles de fontaine sont regroupés dans la Fig. 5-4.

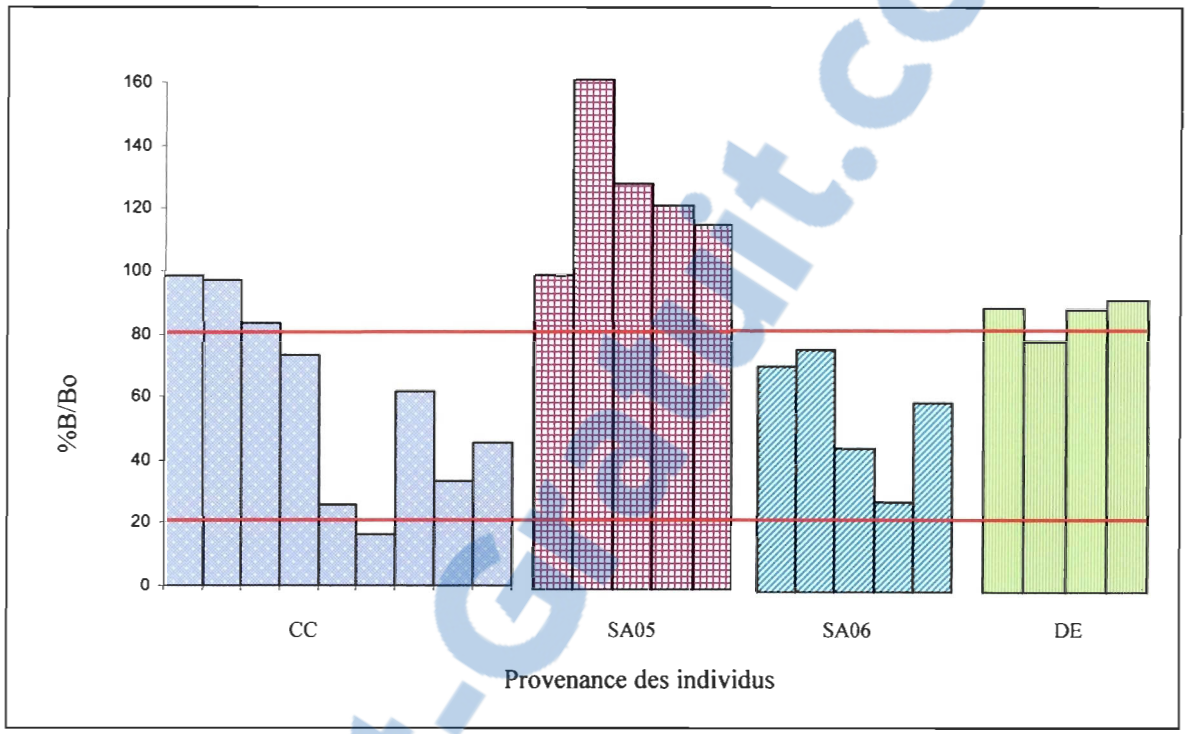

Fig. 5-4 : Dosages RIA sur plasma d'omble de fontaine de diverses provenances. Les traits rouges représentent les dosages effectués avec succès à l'intérieur des limites de détection 20-80 %B/Bo.

Efficacité de la technique RIA pour doser la GH chez *S. fontinalis*

Les résultats des dosages préliminaires sur plasma d'omble de fontaine nous ont obligé à vérifier l'efficacité de la technique pour le dosage de la GH chez cette espèce. L'impossibilité de doser la plupart des échantillons pouvait provenir d'un manque de sensibilité de la technique ou de la présence trop faible de GH dans les échantillons. Des tests ont donc été faits sur des concentrés de molécules plasmatiques. Le but de ces tests était de valider si le RIA hétérologue permettait le dosage de cette hormone lorsque

Rapport-Gratuit.com

présente à des concentrations supérieures. Même avec du plasma concentré jusqu'à 10 fois, il a été impossible de doser de la GH dans ces échantillons. Des analyses ont ensuite été effectuées sur des homogénats d'hypophyses. Cette glande étant responsable du stockage et de la sécrétion de la GH chez les vertébrés. Ceci devait permettre de vérifier si le RIA hétérologue peut doser la GH *S. fontinalis* lorsque présente à forte concentration. Tel qu'attendu, il a été possible de doser la GH *S. fontinalis* dans les divers homogénats d'hypophyses testés. Des homogénats passés sur filtres Amicon-Ultra ont également été testés et dosés avec succès dans tous les cas. Ces données recueillies en utilisant du matériel en provenance d'hypophyses confirment que le RIA hétérologue avec anti-GH saumon/truite reconnaît la GH de *S. fontinalis,* lorsque présente en quantité suffisante. La Fig. 5-5 résume les données recueillies. L'écart type pour chacun des points de la courbe, toutes valeurs confondues, varie de 0,2 à 3,2 %B/Bo.

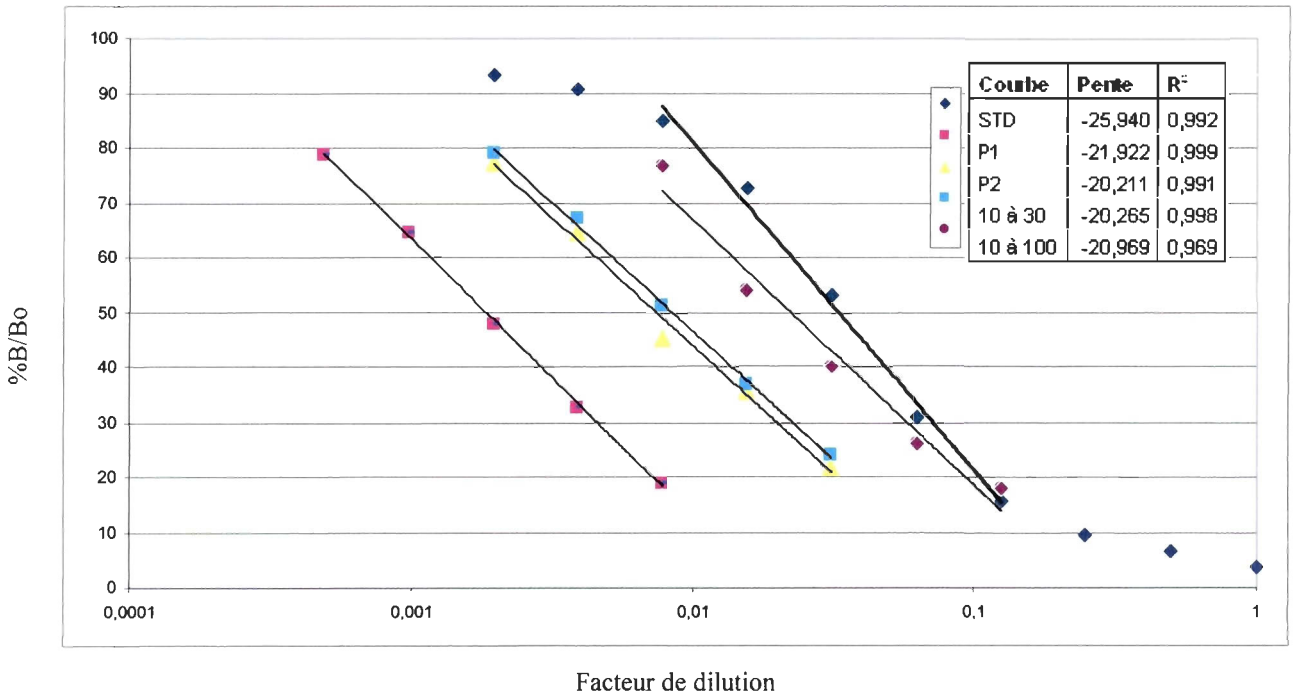

Fig. 5-5 : Pentes en RIA, en comparaison avec la courbe standard GH saumon/truite.

Les données démontrent la reconnaissance de la GH de *S. fontinalis* par l'anti-GH saumon/truite alors que les pentes obtenues sont du même ordre de grandeur. Une étude de parallélisme a été effectuée afin de confirmer cette affirmation quant à l'efficacité du RIA développé. La pente de la courbe standard de GH saumon/truite a été comparée à celles obtenues avec diverses dilutions d'homogénats d'hypophyses, de concentrés d'hypophyses et de la GH partiellement purifiée par FPLC. Aucune dilution de plasma ou concentré de plasma n'a cependant pu être utilisée pour l'étude du parallélisme, puisque aucun échantillon testé ne contenait suffisamment de GH pour permettre son dosage. Les pentes sont déterminées en utilisant exclusivement les points de la courbe situés à l'intérieur des limites de dosabilité 20-80%. L'étude de covariance effectuée avait pour but de valider l'hypothèse nulle selon laquelle les pentes peuvent êtes considérées comme semblables.

Les résultats ont démontré que les pentes provenant des échantillons de GH *S. fontinalis* sont significativement semblables. Les résultats obtenus lors de la comparaison des pentes avec la courbe standard de GH confirment qu'il y a peu ou pas d'évidence pour réfuter l'hypothèse nulle. Dans l'ensemble, on peut considérer que le RIA utilisé permet le dosage semi-quantitatif de la GH chez *S.fontinalis* à l'aide d'anti-GH saumon/truite déjà disponible sur le marché. De récentes évidences montrent un lien phylogénétique étroit entre les genres *Salvelinus* et *Oncorhynchus* (Crespi et Fulton 2004) et pourraient expliquer la reconnaissance observée dans la présente étude. Les différences observées dans les pentes provenant des échantillons versus la courbe standard de GH saumon/truite peuvent provenir d'un biais causé par la faible proportion de GH dans ces échantillons. Le Bail et al. (1991) ont d'ailleurs utilisé des échantillons de plasma à fortes teneurs en GH (en moyenne 10 ng/ml) pour leur étude de parallélisme. Tel que discuté précédemment, l'amélioration

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

des techniques a permis d'améliorer les résultats en améliorant la qualité des échantillons et les quantités de GH présentes. Des dosages ont donc été faits en utilisant la GH partiellement purifiée pour *S. fontinalis*. Une étude de covariance a démontré qu'il y a peu ou pas d'évidence pour réfuter l'hypothèse nulle, selon laquelle les deux pentes observées sont semblables (Fig. 5-6). Ces résultats suggèrent que le RIA hétérologue reconnait la GH *S. fontinalis*.

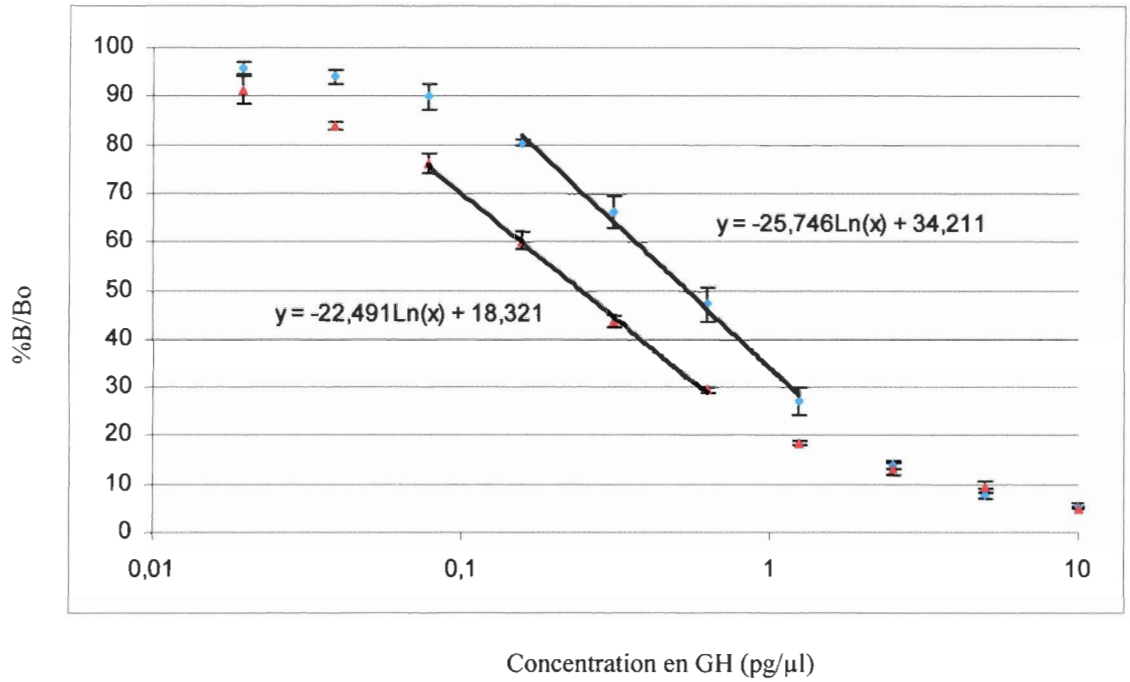

Fig. 5-6 : Pentes en RIA pour la courbe standard GH saumon/truite et la GH purifiée de *S. fontinalis*.

Chapitre 6 :

Discussion générale

La GH chez *S. fontinalis* et son rôle dans la CC

L'hypothèse initiale stipulait que le phénomène de CC, observé chez *S. fontinalis*, était corrélé avec une hausse de la GH plasmatique. Pour vérifier cette afirmation, une technique a été mise au point et validée pour le dosage de cette hormone chez cette espèce. Les résultats n'ont pas permis d'accepter l'hypothèse. L'efficacité et la spécificité du RIA hétérologue développé ont été testées en profondeur et il ne fait aucun doute que cette technique permet le dosage de la GH chez *S. fontinalis*. L'hypothèse est donc rejetée et deux explications peuvent être en cause. Soit les teneurs en GH sont demeurées basses tout au long du phénomène, soit la hausse de GH n'a pas été decelée dans le cadre du schéma expérimental utilisé. En effet, Cameron et al. (2007) ont observé une baisse des taux de GH plasmatiques chez *S. alpinus* durant la période de privation. Une telle réponse physiologique peut être présente chez *S. fontinalis*, vu la proximité phylogénique de ces deux espèces. De même, les prélèvements sanguins ont été faits seulement lorsque la taille des groupes en induction de CC a été significativement différente de celle du groupe contrôle. Sumpter et al. (1991) ont démontré que la hausse de GH peut avoir lieu pendant la période de jeûne. Un début d'échantillonnage plus tôt aurait peut-être permis de mieux déceler les variations de GH chez *S. fontinalis* pendant la période de jêune et la réalimentation. Une hausse probable de GH a en effet pu avoir lieu durant le jeûne et non lors du phénomène de CC, tel qu'attendu. La mesure de la GH plasmatique chez *S. fontinalis*, selon le chéma expérimental utilisé, ne représente donc pas un indicateur fiable pour mieux comprendre le rôle de la GH dans la CC chez cette espèce.

Le but initial de la recherche était de doser les teneurs en GH dans des échantillons de plasma d'omble de fontaine, provenant d'expériences de CC. Les résultats devaient

contribuer à mieux comprendre le rôle de la GH dans la CC chez *S. fontinalis*. Afin d'y parvenir, un RIA hétérologue a été mis au point à l'aide de GH et anti-GH saumon/truite disponibles sur le marché (GroPep). Tel que discuté, les diverses analyses effectuées ont démontré la validité de cette méthode pour mesurer la GH chez *S. fontinalis* et ainsi permettre son dosage semi-quantitatif. Des tests effectués sur GH saumon/truite ainsi que sur GH *S. fontinalis* en provenance de l'hypophyse ont de plus confirmé la reconnaissance de la GH à l'intérieur des limites de détection attendue. Cependant, le problème majeur rencontré lors des analyses a été la faible présence de GH dans les échantillons de plasma à doser. Les teneurs en GH ont pu être dosées dans seulement un faible nombre d'échantillons. Il a été impossible d'établir une corrélation nette entre les taux de GH mesurés, le degré et la durée de restriction alimentaire.

Teneurs de GH en circulation

La compagnie GroPep stipule dans son protocole que les taux normalement observés chez les espèces de saumon/truite se situent entre 0,2 et 0,5 ng/ml. Ces valeurs se situent à la limite de détection inférieure obtenue avec le RIA hétérologue développé. Toutefois, tel que mentionné ci-haut, divers facteurs peuvent faire varier ces valeurs et ainsi les faire baisser en dessous des limites de détection. Les faibles concentrations de GH plasmatiques observées naturellement rendent alors difficile le dosage de cette hormone, malgré le développement d'un RIA sensible et efficace. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude soutiennent ceux obtenus par d'autres chercheurs. Le Bail et al. (1991) ont démontré que les taux de GH plasmatique chez des individus en santé et en période de croissance sont faibles, de même que chez des juvéniles sexuellement immatures. Frantzen et al. (2004) ont noté chez *S. alpinus* des taux de GH variant aux alentours de 2 à 4 ng/ml

sur une base annuelle. De même, les variations observées entre des individus sous restriction alimentaire et d'autres nourris sont faibles, avec des valeurs à l'intérieur des mêmes intervalles. Sumpter et al. (1991) ont observés un taux basal de GH d'environ 1 ng/ml chez la truite arc-en-ciel. Ils ont toutefois observé un accroissement de six fois le taux de GH basal chex les individus en privation. Une telle variation aurait été decelée dans notre étude si elle avait eu lieu, aux périodes échantillonées.

Les taux de GH plasmatiques résultent d'un équilibre entre le taux de sécrétion et le taux d'élimination. Conséquemment, l'analyse des taux de GH plasmatiques doit être faite avec précaution. Une augmentation du taux de GH sanguin ne correspond pas systématiquement à une augmentation du taux de sécrétion comme on le croit souvent à tort. Un tel changement peut provenir aussi de la rétention de la GH déjà présente dans l'organisme via une diminution de son excrétion. Il ne faut pas négliger non plus l'importance des récepteurs et leur affinité pour la GH, peu importe le taux de GH en circulation. Une augmentation du taux en circulation ne se traduit pas nécessairement par des changements physiologiques si les récepteurs appropriés sont inactifs, si des antagonistes sont présents ou encore si les organes cibles ne sont pas réceptifs. À l'inverse, une faible quantité d'hormone peut avoir un effet stimulateur si les récepteurs ou les organes cibles sont réceptifs, si l'hormone agit en synergie avec d'autres molécules ou encore si l'action d'antagonistes est limitée.

Afin que la mesure de la concentration de GH en circulation soit précise, le prélèvement ne doit pas être effectué de façon aléatoire. Des facteurs tels que la période de la journée, l'heure du dernier repas, le statut nutritionel, le statut hormonal et le niveau de

stress peuvent influencer les taux de GH présents dans le sang. Les mesures en GH ainsi obtenues peuvent être biaisées si ces facteurs ne sont pas considérés. C'est pourquoi le dosage de la GH plasmatique est complexe et les données obtenues doivent être interprétées avec précaution. Puisque les teneurs en hormones dans le sang varient tout au long de la journée, il est important d'effectuer les prélèvements selon un horaire constant. Dans le cadre de l'étude de CC, les prélèvements ont été effectués en début de journée tout au long de l'étude, afin d'assurer la constance des résultats. En général, un pic de GH est observé suivant le lever du jour et baisse ensuite de façon constante pendant la journée (Boujard et Leatherland 1992).

Utilisation d'un RIA hétérologue

L'efficacité d'un RIA hétérologue

Tel que discuté au Chapitre 1, l'efficacité des RIA hétérologues est parfois remise en question. Wagner et McKeown (1986) ont toutefois démontré qu'un RIA développé pour la GH de saumon keta (*Oncorhynchus keta*) peut être utilisé pour mesurer avec succès la GH d'autres espèces du genre *Oncorhynchus*. Le Bail et al. (1993) ont démontré que la GH plasmatique et en provenance de l'hypophyse de plusieurs espèces de sparidés peut être mesurée avec un RIA développé pour la GH de la dorade *Sparus aurata*. Cameron et al. (2002) ont utilisé un anticorps contre la GH recombinante de saumon dans un ELISA pour mesurer la GH de l'omble arctique *Salvelinus alpinus*. Il est à noter que cet anticorps, qui réagit avec la GH de l'omble arctique, est très semblable à l'anticorps du RIA de cette présente étude.

L'efficacité d'un RIA dépend toutefois de divers facteurs. La qualité des réactifs utilisés est importante et une attention particulière doit être apportée afin de préserver leur intégrité. La GH marquée doit être manipulée et conservée avec grand soin (Peake et al. 1979). L'inactivation immunologique de l'hormone peut également biaiser l'interprétation des résultats, même si ce phénomène peut avoir lieu sans perte d'activité biologique (Nicoll 1975). Toutefois, les hormones stéroïdes ne semblent pas affecter de façon significative les mesures de la GH lors du RIA. De même, d'autres hormones pituitaires ainsi que la T4 et la T3 n'altèrent pas l'essai (Peake et al. 1979).

Les différences structurales entre l'hormone présente dans l'hypophyse et les formes en circulation peuvent également poser une difficulté. Ceci pourrait expliquer pourquoi un RIA reconnaissant l'hormone purifiée à partir de l'hypophyse peut ne pas être efficace pour mesurer cette hormone dans le sang. Diverses formes de GH sont présentes dans l'hypophyse et dans le plasma, alors que les techniques d'immunoessais sont généralement développées à partir d'une seule forme de GH isolée en provenance de la glande ou à partir de GH recombinante (Nicoll 1975, Wood 2001, Zhan et al. 2005). Les formes de GH plasmatiques possèdent des champs d'action biologiques différents et conséquemment, leur réaction avec l'anti-GH utilisé lors d'essais peut varier même si la base de leur structure demeure similaire (Boguszewski et al. 1997, Wood 2001, Giorgianni et al. 2004, Soares 2004, Fisker 2006, De Palo et al. 2006). Il devient alors quasi impossible de savoir quelle(s) forme(s) de GH réagissent avec l'essai et de ce fait, à quel niveau les résultats sont représentatifs des concentrations totales de GH présentes en circulation. Des fragments de GH peuvent également réagir avec l'essai. L'importance de ces fragments de GH ne doit pas être négligée, alors qu'ils peuvent jouer un rôle primordial dans diverses

activités biologiques (De Palo et al. 2006). L'utilisation d'hormone recombinante pour le développement des essais, notamment dans le cadre de ce projet, peut également modifier la sensibilité du RIA. L'efficacité des RIA hétérologues peut également varier selon l'antisérum utilisé (Peake et al. 1979). Lors d'immunoessais, Wood (2001) souligne que l'utilisation d'anticorps polyclonaux tend à reconnaître une plus grande quantité de formes de GH et ainsi permet d'obtenir des résultats plus représentatifs que ceux obtenus avec des anticorps monoclonaux. La réactivité croisée des anticorps polyclonaux est presque totale pour les preparations de GH provenant d'espèces de la même famille (Pérez-Sanchez 2000).

En somme, il faut toujours tenir compte des limitations de chaque méthode utilisée et bien en connaître les conséquences. Aucune méthode ne parvient à mesurer toutes les formes de GH présentes en circulation et elles sous estiment ainsi la quantité d'hormone active biologiquement dans le sang. À cela s'ajoute que l'importance et les rôles respectifs des diverses formes et fragments de GH restent encore à élucider.

Interaction avec la PRL

Puisque la GH et la PRL sont deux molécules apparentées, la PRL est la molécule risquant le plus de réagir avec l'anti-GH lors des essais. Afin de vérifier si un tel phénomène pouvait entraîner un biais dans le RIA hétérologue développé, divers électrophorèses et Western-blot utilisant la GH et l'anti-GH saumon/truite, ainsi que la PRL et l'anti-PRL *S. fontinalis* ont été faits. Des RIA sur des dilutions successives de PRL ont également été effectués. Dans tous les cas, les résultats ont démontré qu'il n'y avait pas ou peu d'interaction croisée entre l'anti-GH saumon/truite et la PRL de *S. fontinalis*. Ces

Rapport-Gratuit.com

résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bolton et al. (1986) dans leur étude chez *Oncorhynchus keta* alors qu'ils n'ont détecté aucune réaction croisée dans leurs essais, ni avec la PRL ou toute autre glycoprotéine isolée de l'hypophyse. Les études menées par Pérez-Sanchez et al. (1994b) chez *Sparus aurata* et par Ricordel et al. (1995) chez *Oreochromis niloticus* démontrent aussi que les récepteurs pour la GH ne reconnaissent pas la PRL. Ceci renforce l'idée que l'anti-GH, lorsque utilisé sur les échantillons en provenance de l'hypophyse, permet de reconnaître la GH et non la PRL. Pour les besoins de l'étude en cours, l'anti-GH saumon/truite peut donc être utilisé avec efficacité dans la reconnaissance de la GH *S. fontinalis*, sans soucis d'interaction croisée avec la PRL aux concentrations testées.

Dégradation des protéines

La problématique de la conservation des protéines, en particulier la GH *S. fontinalis*, a été soulevée au cours des analyses effectuées. Les résultats préliminaires ont démontré un problème au niveau de la quantité de GH conservée au fil des manipulations. Des teneurs de GH en-dessous de celles attendues ont été décelée dans les échantillons préparés. La bande de GH réagissant en Western-blot n'apparaissait pas sur la coloration au bleu de Coomassie alors que le chromatogramme des premiers tamisages moléculaires sur colonne FPLC ne présentait aucun pic aux fractions contenant la GH monomérique. Les diverses approches testées ont démontré l'impact des manipulations sur la conservation de la GH dans les échantillons. La congélation des homogénats d'hypophyses et leur filtration était à proscrire, puisque ces étapes ont provoqué une perte de GH. L'utilisation d'hypophyses prélevées sur des ombles de fontaine vivants a également donné de meilleurs résultats, tout comme la sélection de truites en bonne santé et de petite taille (30cm environ). Ceci

démontre l'importance de préserver l'intégrité des protéines à l'étude puisqu'elles peuvent subir diverses modifications chimiques et physiques. La structure primaire complexe des protéines favorise la présence de sites réactifs (Pikal et al. 1991, Schulga et al. 2002).

Une protéine instable peut être modifiée par la formation de liens covalents ou en se scindant pour produire une nouvelle entité chimique. L'oxygène atmosphérique peut oxyder les résidus présents dans les protéines (Manning et al. 1989, Pikal et al. 1991, Cholewinski et al. 1996). L'oxydation est influencée par la température, le pH, le tampon utilisé, la présence de catalyseur et la tension en oxygène. En général, le taux d'oxydation augmente avec le pH (Manning et al. 1989). La déamination des protéines est aussi influencé par le pH. Certaines protéines doivent toutefois être dénaturées avant d'être déaminées (Manning et al. 1989). Ces formes déaminées et oxydées peuvent montrer une baisse d'activité biologique (Manning et al. 1989) ou conserver la même activité (Cholewinski et al. 1996). Ces dommages chimiques peuvent avoir lieu pendant la manipulation, la conservation et la décongélation de toute substance (Rubinsky 2003).

Une protéine physiquement instable peut changer de structure secondaire, tertiaire ou quaternaire. Ces changements incluent les processus de dénaturation, d'adsorption aux surfaces, d'agrégation et de précipitation (Manning et al. 1989, Pikal et al. 1991, Cholewinski et al. 1996). Ces changements de structure peuvent provoquer une modification de l'activité biologique des protéines (Kasimova et al. 1998, Schulga et al. 2002, Jorgensen et al. 2003). La dénaturation peut être causée par un changement de température, la congélation, des pH extrêmes ou la présence d'agents dénaturants. La dénaturation thermique de la hGH est un processus irréversible qui cause le déploiement

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

partiel de la protéine et provoque son agrégation (Schulga et al. 2002, Atri et al. 2005). La température de dénaturation s'abaisse avec une élévation de la concentration et la taille des agrégats formés augmente avec la concentration en protéines (Kasimova et al. 1998). La dénaturation de la hGH tend à être irréversible à forte concentration (Schulga et al. 2002). Une molécule dénaturée peut s'agréger à d'autres molécules, précipiter ou réagir chimiquement (Manning et al. 1989).

Les agrégats peuvent être solubles ou insolubles et proviennent de liaisons covalentes et non-covalentes. Les agrégats solubles se composent de dimères, trimères et autres oligomères. Les agrégats insolubles forment des particules qui peuvent précipiter (Eckhardt et al. 1991, Cholewinski et al. 1996). Une fois dénaturée, des zones hydrophobiques de la molécule sont exposées ce qui crée une situation instable et provoque l'agrégation (Cholewinski et al. 1996, Kasimova et al. 1998). L'augmentation de la surface de contact air / eau et une grande concentration en protéines provoquent également la dénaturation et la formation subséquente d'agrégats (Cholewinski et al. 1996). Une solution de GH a donc tendance à s'agréger et précipiter au contact de l'air pour former des dimères ou autres agrégats de haut poids moléculaire (Hagenlocher et Pearlman 1989, Manning et al. 1989, Pikal et al. 1991, Cholewinski et al. 1996). Les expériences de Eckhardt et al. (1991) ont en effet démontré que des préparations de hGH concentrées, diluées puis dialysées contiennent le double d'agrégats solubles comparativement aux solutions non traitées. La congélation provoque aussi la formation d'agrégats (Eckhardt et al. 1991, Cholewinski et al. 1996, Maa et Hsu 1996) puisque ce processus retire l'eau en solution et modifie l'environnement où baignent les molécules (Rubinsky 2003). La concentration des protéines, sels, solutés et autres augmente drastiquement dans la portion non gelée,

provoquant la dénaturation des protéines présentes et la formation d'agrégats (Eckhardt et al. 1991, Maa et Hsu, 1996, Rubinsky 2003). Le taux d'agrégats insolubles augmente avec une plus grande vitesse de congélation, aussi relié à une baisse du contenu total en monomères (Eckhardt et al. 1991). Un refroidissement lent favorise la formation de cristaux de glace larges, alors qu'une congélation rapide favorise les petits cristaux. Les résultats obtenus par Eckhardt et al. (1991) démontrent que la congélation rapide provoque la formation d'agrégats insolubles et une diminution des monomères. Les petits cristaux augmentent la surface de contact avec les protéines et leur réarrangement lors de la décongélation, alors qu'ils recristallisent, cause la dénaturation des protéines.

La formation d'agrégats pose problème pour diverses raisons : réduction de l'activité biologique, implication dans des réactions immunogéniques, changement des caractéristiques physiques de la solution et perte de matériel liée à la précipitation de ces agrégats. La préservation de la bonne intégrité des échantillons est donc primordiale. Cet aspect peut expliquer en partie la faible présence de GH décelée dans certains échantillons et les problèmes rencontrés lors des étapes de mise au point des méthodes utilisées.

Possibilités de recherche et autres approches

La croissance est influencée par une foule de facteurs endogènes et exogènes. Avant même de parler de CC et des manières d'optimiser ce phénomène, il est crucial de bien connaître les facteurs influençant la croissance afin d'en tirer profit. Les conditions de maintien des individus, le développement d'une nourriture adaptée et de cycles de régimes appropriés, la sélection d'individus à forte croissance et d'autres approches doivent être étudiées et des avenues autres que la CC doivent être envisagées. Le transfert de gènes de

GH provenant d'autres espèces semble un moyen prometteur d'accroître le potentiel de croissance des individus transgéniques (Cavari et al. 1993, Krasnov et al. 1999, Pitkänen et al. 1999) bien que les effets dépendent de l'espèce choisie (Devlin et al. 2001). Une croissance jusqu'à 14 fois supérieure a été ainsi obtenue chez des ombles chevalier en leur transférant des gènes GH de saumon sockeye (Pitkänen et al. 1999) alors que de tels ombles transgéniques montrent un accroissement du taux métabolique et une meilleure utilisation de la nourriture, en acquérant les caractéristiques de l'espèce dont les gènes proviennent (Krasnov et al. 1999). Il demeure toutefois que la sélection naturelle d'individus ayant un meilleur potentiel de croissance a déjà fait ses preuves et diminue le besoin de recourir à des individus transgéniques pour l'obtention d'une forte croissance (Devlin et al. 2001). De nouvelles techniques en biologie moléculaire, telle que l'utilisation des mRNA, semblent prometteuses. Ces approches possèdent toutefois des limitations. Nottament, le recours à des anticorps monoclonaux est reliée à une sensibilité moindre dans des cas similaires à celui présenté dans cette étude. La combinaison de diverses approches, spécifiques pour chaque espèce, représente donc l'option la plus adaptée.

Il serait aussi intéressant de procéder à la purification complète de la GH pour *S. fontinalis* afin de développer les anticorps propres à cette hormone. Ceci rendrait possible le développement de techniques de mesures homologues pour la GH, la comparaison entre les deux RIA (homologues vs hétérologues) et l'approfondissement des connaissances quant aux caractéristiques physico-chimiques de cette hormone. Une approche intéressante pour l'isolation de la GH pourrait être l'utilisation de chromatographie d'affinité utilisant la GH saumon/truite puisque sa bonne réactivité avec l'antigène a été démontrée dans cette étude. La purification sur HPLC représente également une alternative prometteuse.

Bibliographie

Adelman, I.R. 1977. Effects of bovine growth hormone on growth of carp (*Cyprinus carpio*) and the influence of temperature and photoperiod. Journal of the Fisheries Resource Board of Canada. 34: 509-515.

Agustsson, T. et Björnsson, B.T. 2000. Growth hormone inhibits growth hormone secretion from the rainbow trout pituitary *in vitro*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. 126: 299-303.

Agustsson, T. Ebbesson, L.O. et Björnsson, B.T. 2000. Dopaminergic innervation of the rainbow trout pituitary and stimulatory effect of dopamine on growth hormone secretion *in vitro*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 127: 355-364.

Agustsson, T., Sundell, K., Sakamoto, T., Johansson, V., Ando, M. et Björnsson, B.Th. 2001. Growth hormone endocrinology of Atlantic salmon (*Salmo salar*): pituitary gene expression, hormone storage, secretion and plasma levels during parr-smolt transformation. Journal of Endocrinology. 170: 227-234.

Ali, M., Iqbal, R., Rana, S.A., Athar, M. et Iqbal, F. 2006. Effect of feed cycling on specific growth rate, condition factor and RNA/DNA ratio of *Labeo rohita*. African Journal of Biotechnology. 5: 1551-1556.

Arsham, Hossein. 2007. Analysis of covariance: Comparing two linear regressions. University of Baltimore. http://home.ubalt.edu/ntsbarsh/Business-stat/otherapplets/ANOCOV.htm.

Atri, M.S., Saboury, A.A., Rezaei-Tavirani, M., Sanati, M.H., Moosavi-Movahedi, A.A., Sadeghi, M., Mansuri-Torshizi, H. et Khodabandeh, M. 2005. Binding properties and conformational change of human growth hormone upon interaction with Fe3+. Thermochimica Acta. 438: 178-183.

Ayson, F.G., Kaneko, T., Tagawa, M., Hasegawa, S., Grau, E.G., Nishioka, R.S., King, D.S., Bern, H.A. et Hirano, T. 1993. Effects of acclimation to hypertonic environment on plasma and pituitary levels of two prolactins and growth hormone in two species of

tilapia, *Oreochromis mossambicus* and *Oreochromis niloticus*. General and Comparative Endocrinology. 89: 138-148.

Baker, D.M., Davies, B., Dickhoff, W.W. et Swanson, P. 2000. Insulin-like growth factor I increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH release from coho salmon pituitary cells *in vitro*. Biology of Reproduction. 63: 865-871.

Barreto, R.E., Moreira, P.S.A. et Carvalho, R.F. 2003. Sex-specific compensatory growth in food-deprived Nile tilapia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 36: 477-483.

Belanger, F., Blier, P.U. et Dutil, J.-D. 2002. Digestive capacity and compensatory growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Fish Physiology and Biochemistry. 26: 121-128.

Björnsson, B.Th. 1997. The biology of salmon growth hormone : from daylight to dominance. Fish Physiology and Biochemistry. 17: 9-24.

Björnsson, B. Th., Taranger, G.L., Hansen, T., Stefansson, S.O. et Haux, C. 1994. The interrelation between photoperiod, growth hormone, and sexual maturation of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). General and Comparative Endocrinology. 93: 70-81.

Björnsson, B.Th., Stefansson, G.V., Berge, A.I., Hansen, T. et Stefansson, S.O. 1998. Circulating growth hormone levels in Atlantic salmon smolts following seawater transfer: effects of photoperiod regime, salinity, duration of exposure and season. Aquaculture. 168: 121-137.

Boguszewski, C., Jansson, C., Boguszewski, M.C.S., Rosberg, S., Wikland, K.A., Carlsson, B. et Carlsson, L.M.S. 1997. Circulating non-22kDa growth hormone isoforms in healthy children of normal stature: relation to height, body mass and pubertal development. European Journal of Endocrinology. 137: 246-253.

Bolton, J.P., Takahashi, A., Kawauchi, H., Kubota, J. et Hirano, T. 1986. Development and validation of a salmon growth hormone radioimmunoassay. General and Comparative Endocrinology. 62: 230-238.

Boujard, T. et Leatherland, J.F. 1992. Diel cycle in *Oncorhynchus mykiss* using demand-feeder and held in different photoperiod regimes : circadian pattern of food-demand liver composition and hormone concentration *Dans* Fish Nutrition in Practice. Edited by S.J. Kaushik. I.N.R.A. Paris.

Boula, D., Castric, V., Bernatchez, L. et Audet, C. 2002. Physiological, endocrine, and genetic bases of anadromy in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*, of the Laval River (Québec, Canada). Environmental Biology of Fishes. 64: 229-242.

Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. *Dans* Fish Physiology. Vol. VIII, Bioenergetics and Growth. Academic Press, New York. Pp. 599-675.

Broekhuizen, N., Gurney, W.S.C., Jones, A. et Bryant, A.D. 1994. Modelling compensatory growth. Functional Ecology. 8: 770-782.

Cameron, C., Gurure, R., Reddy, K., Moccia, R. et Leatherland, J. 2002. Correlation between dietary lipid:protein ratios and plasma growth and thyroid hormone levels in juvenile Artic charr, *Salvelinus alpinus* (Linnaeus). Aquaculture Research. 33: 383-394.

Cameron, C., Moccia, R.D. et Leatherland, J.F. 2005. Growth hormone secretion from the Artic charr (*Salvelinus alpinus*) pituitary gland *in vitro* : effects of somatostatin-14, insulin-like growth factor-I and nutritional status. General and Comparative Endocrinology. 141: 93-100.

Cameron, C., Moccia, R., Azevedo, P.A., et Leatherland, J.F. 2007. Effect of diet and ration on the relationship between plasma GH and IGF-1 concentrations in Artic charr, Salvelinus alpinus (L.). Aquaculture Research. 38: 877-886.

Campbell, B., Dickey, J.T. et Swanson, P. 2003. Endocrine changes during onset of puberty in male spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Biology of Reproduction. 69: 2109-2117.

Cavari, B., Hong, Y., Funkenstein, B., Moav, B. et Schartl, M. 1993. All-fish gene constructs for growth hormone gene transfer in fish. Fish Physiology and Biochemistry. 11: 345-352.

Chang, J.P., Yu, K.L., Wong, A.O.L. et Peter, R.E. 1990. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. Neuroendocrinology. 51:661-674.

Chang, Y.S., Liu, C.S., Huang, F.L. et Lo, T.B. 1992. The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: bighead carp, silver carp, and grass carp. General and Comparative Endocrinology. 87: 385-393.

Chatakondi, N.G. et Yant, R.D. 2001. Application of compensatory growth to enhance production in channel catfish *Ictalurus punctatus*. Journal of the World Aquaculture Society. 32: 278-285.

Cholewinski, M., Lückel, B., et Horn, H. 1996. Degradation pathways, analytical characterization and formulation strategies of a peptide and a protein calcitonine and human growth hormone in comparison. Pharmaceutica Acta Helvetiae. 71: 405-419.

Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S. et Pérez-Sanchez J. 1999. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream *(Sparus aurata)*: risks and benefits of high energy diets. Aquaculture 171: 279-292.

Company, R., Astola, A., Pendòn, C. Valdivia, M.M. et Pérez-Sanchez, J. 2001. Somatotropic regulation of fish growth and adiposity : growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. 130: 435-445.

Rapport-Gratuit.com

Cook, A.F., Wilson, S.W. et Peter, R.E. 1983. Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. General and Comparative Endocrinology. 50: 335-347.

Crespi, B. J. et Fulton, M.J. 2004. Molecular systematics of salmonidae : combined nuclear data yields a robust phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 658-679.

Cyr, D.G., Idler, D.R., Audet, C., McLeese, J.M. et Eales, J.G. 1998. Effects of long-term temperature acclimatation on thyroid hormone deiodinase function, plasma thyroid hormone levels, growth, and reproductive status of male Atlantic cod, *Gadus morhua*. General and Comparative Endocrinology. 109: 24-36.

Danzman, R.G., Van Der Kraak, G. J., Chen, T.T. et Powers, D.A. 1990. Metabolic effects of bovine growth hormone and genetically engineered rainbow trout growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at a high temperature. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 47: 1292-1301.

Degani, G., Boker, R. et Jackson, K. 1996. Growth hormone, gonad development, and steroid levels in female carp. Comparative Biochemistry and Physiology. 115C: 133-140.

De Palo, E.F., De Filippis, V., Gatti, R. et Spinella, P. 2006. Growth hormone isoforms and segments / fragments : Molecular structure and laboratory measurement. Clinica Chimica Acta. 364: 67-76.

Devlin, R.H., Biagi, C.A., Yesaki, T.Y., Smailus, D.E. et Byatt, J.C. 2001. Growth of domesticated transgenic fish. Brief Communications. Nature. 409:781-782.

Dobson, S.H et Holmes, R.M. 1994. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology. 25: 649-656.

Donaldson, E.M., Fagerlung, U.H.M., Higgs, D.A. et McBride, J.R. 1979. Hormonal enhancement of growth *Dans* Fish Physiology. Vol. VIII, Bioenergetics and Growth. Academic Press, New York. Pp. 455-597.

Eckhardt, B.M., Oeswein, J.Q. et Bewley, T.A. 1991. Effect of freezing on aggregation of human growth hormone. Pharmaceutical Research. 8: 1360-1365.

Einarsdottir, I.E., Sakata, S. et Björnsson, B. Th. 2002. Atlantic halibut growth hormone: structure and plasma levels of sexually mature males and females during photoperiod-regulated annual cycles. General and Comparative Endocrinology. 127: 94-104.

Farbridge, K.J. et Leatherland, J.F. 1992. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. Fish Physiology and Biochemistry. 10: 67-73.

Farmer, S.W., Papkoff, H., Hayashida, T., Bewley, T.A., Bern, T.A. et Li, C. H. 1976. Purification and properties of teleost growth hormone. General and Comparative Endocrinology. 30: 91-100.

Fine, M., Sakal, E., Vashdi, D., Daniel, V., Levanon, A., Lipshitz, O. et Gertler, A. 1993. Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification, and determination of biological activity in vitro and *in vivo*. General and Comparative Endocrinology. 89: 51-61.

Fisker, S. 2006. Physiology and pathophysiology of growth hormone-binding proteins: methodological and clinical aspects. Growth Hormone and IGF Research. 16: 1-28.

Frantzen, M., Damsgard, B., Tveiten, H., Moriyama, S., Iwata, M. et Johnsen, H.K. 2004. Effects of fasting on temporal changes in plasma concentrations of sex steroids, growth hormone and insulin-like growth factor I, and reproductive investment in Arctic charr. Journla of Fish Biology. 65: 1526-1542.

Gaylord, T.G. et Gatlin III, D.M. 2000. Assessment of compensatory growth in channel catfish *Ictalurus punctatus* and associated changes in body condition indices. Journal of the World Aquaculture Society. 31: 326-336.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Gaylord, T.G. et Gatlin III, D.M. 2001. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture. 194: 337-348.

Giorgianni, F., Beranova-Giorgianni, S. et Desiderio, D.M. 2004. Identification and characterization of phosphorylated proteins in the human pituitary. Proteomics. 4: 587-598.

Gomez, J.M., Boujard, T., Bœuf, G., Solari, A. et Le Bail, P.-Y. 1997. Individual diurnal plasma profiles of thyroid hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to cortisol, growth hormone, and growth rate. General and Comparative Endocrinology. 107: 74-83.

Gomez, J.M., Loir, M., et Le Gac, F. 1998. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenetic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction. 58: 483-491.

GroPep. Novozymes Gropep Ltée. Adelaide. Australia. http://www.gropep.com

Hagenlocher, M. et Pearlman, R. 1989. Use of a substituted cyclodextrin for stabilization of solutions of recombinant human growth hormone. Pharmacology Ressource. 6: S30.

Hayward, R.S., Noltie, D.B. et Wang, N. 1997. Notes : use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. Transactions of the American Fisheries Society. 126: 316-322.

Hogman, W.J. 1968. Annulus formation on scales of four species of coregonids reared under artificial conditions. Journal of the Fisheries Ressource Board of Canada. 25: 2111-2122.

Holloway, A.C. et Leatherland, J.F. 1998. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 8: 409-429.

Hull, K.L. et Harvey, S. 2000. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? Reviews of Reproduction. 5: 175-182.

Jackson, L.F., Swanson, P., Duan, C., Fruchtman, S. et Sullivan, C.V. 2000. Purification, characterization, and bioassay of prolactin and growth hormone from temperate basses, genus *Morone*. General and Comparative Endocrinology. 117: 138-150.

Jobling, M., Joergensen, E.H. et Siikavuopio, S.I. 1993. The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Journal of Fish Biology. 43: 409-419.

Jobling, M. et Koskela, J. 1996. Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. Journal of Fish Biology. 49: 658-667.

Jobling, M. Koskela, J. et Winberg, S. 1999. Feeding and growth of whitefish fed restricted and abundant rations: influences on growth heterogeneity and brain serotonic activity. Journal of Fish Biology. 54: 437-449.

Johnson, J.I., Peterson, E., Jönsson, E., Björnsson, B. Th. Et Jarvi, T. 1996. Domestication and growth hormone alter antipredator behaviour and growth patterns in juvenile brown trout, *Salmo trutta*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 53: 1546-1554.

Jönsson, E., Johnsson, J.I. et Björnsson, B.T. 1998. Growth hormone increases aggressive behavior in juvenile rainbow trout. Hormone and Behavior. 33: 9-15.

Jönsson, E., Johansson, V., Björnsson, B.T. et Winberg, S. 2003. Central nervous system actions of growth hormone on brain monoamine levels and behavior of juvenile rainbow trout. Hormone and Behavior. 43: 367-374.

Jorgensen, L., Vermehren, C., Bjerregaard, S. et Froekjaer, S. 2003. Secondary structure alterations in insulin and growth hormone water-in-oil emulsions. International Journal of Pharmaceutics. 254: 7-10.

Jorgensen, E.H., Aas-Hansen, O., Moriyama, S., Iwata, M. et Strand, J.E.T. 2007. The parr-smolt transformation of Artic charr is comparable to that of Atlantic salmon. Aquaculture. 273: 227-234.

Kasimova, M.R., Milstein, S.J. et Freire, E. 1998. The conformational equilibrium of human growth hormone. Journal of Molecular Biology. 277: 409-418.

Kawauchi, H., Suzuki, K., Yamakazi, T., Moriyama, S., Nozaki, M., Yamaguchi, K., Takahashi, A., Youson, J. et Sower, S.A. 2002. Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates. Endocrinology. 143:4916-4921.

Kayes, T. 1977. Effects of temperature on hypophyseal (growth hormone) regulation of length, weight and allometric growth and total lipid and water concentrations in the black bullhead *(Ictalurus melas)*. General and Comparative Endocrinology. 33: 382-393.

Kim,, M.K. et Lovell, R.T. 1995. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in Channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. Aquaculture. 135: 285-293.

Krasnov, A., Agren, J.J., Pitkänen, T.I. et Mölsä, H. 1999. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Artic charr (*Salvenius alpinus*). II. Nutrient partitioning in rapidly growing fish. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. 15: 99-105.

Lauritzen, E., Flyge, H. et Holm, A. 1994. Dot immunobinding (DIB), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and radioimmunoassay (RIA) for detecting peptide antigens and specific antibodies *Dans* Antibody techniques. Academic Press. Pp 227-258.

Le Bail, P.Y., Boulard, G., Barenton, B. et Zygmunt, M. 1989. Purification of chinook salmon (*Onchorhychus tshawytsha*) GH for receptor study. Fish Physiology and Biochemistry. 7: 243-251.

Le Bail, P.Y., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., Mourot, B., Niu, P.D., et Weil, C. 1991. Development and validation of a highly sensitive radioimmunoassay for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) growth hormone. General and Comparative Endocrinology. 83: 75-85.

Le Bail, P.Y., Mourot,B., Zohar,Y., et Pérez-Sanchez, J. 1993. Application of a sensitive radioimmunoassay for the measurement of growth hormone in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and other sparid fish. Canadian Journal of Zoology. 71: 1500-1505.

Le François, N.R., P.U. Blier, L.T. Adambounou et Lacroix, M. 1999. Exposures to low-level ionizing radiation : effects on biochemical and whole-body indices of growth in juvenile brook charr (*Salvelinus fontinalis*). Journal of Experimental Zoology. 283: 315-325.

Lin, X.W., Lin, H.R. et Peter, R. 1993. Growth hormone secretion in the common carp (*Cyprinus carpio*): *in vitro* interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and the dopamine agonist apomorphine. General and Comparative Endocrinology. 89: 62-71.

Lin, X., Otto, C.J., Cardenas, R. et Peter, R.E. 2000. Somatostatin family of peptides and its receptors in fish. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 78: 1053-1066.

Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V. et Efstratiadis, A. 2001. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor I in mouse postnatal growth. Developmental Biology. 229: 141-162.

Maa, Y.F. et Hsu, C.C. 1996. Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds. International Journal of Pharmaceutics. 140: 155-168.

MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M. et Leiner, K.A. 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. Aquaculture. 161: 3-25.

Mangel, M. et Munch, S.B. 2005. A life-history perspective on short and long term consequences of compensatory growth. The American Naturalist. 116: 1144-1161.

Manning, M.C., Patel, K., et Borchardt, R.T. 1989. Stability of protein pharmaceuticals. Pharmaceutical Research. 6: 903-918.

MAPAQ. Dulciculture. Dernière mise à jour juin 2006. www.mapaq.gouv.qc.ca.

Marchant, T.A. et Peter, R.E. 1986. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. Journal of Experimental Zoology. 237: 231-239.

Marchant, T.A., Cook, A.F. et Peter, R.E. 1986. The relationship between circulating growth hormone levels and somatic growth in a teleost species, *Carassius auratus Dans* Aquaculture of Cyprinids. INRA. Paris. Pp 43-54.

Marti-Palanca, H., Martinez-Barbera, J.P., Pendon,, C., Valvivia, M.M., Pérez-Sanchez J. et Kaushik, S. 1996. Growth hormone as a function of age and dietary protein : energy ratio in marine teleost, the gilthead sea bream *(Sparus aurata)*. Growth Regulation. 6: 253-259.

Mbow, A. 1999. La prolactine chez l'omble de fontaine : étude de structure et de la fonction osmo-iono-régulatoire. Thèse de doctorat. Université du Québec à Rimouski. Rimouski, Québec.

McCormick, S.D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. American Zoologist. 41: 781-794.

McKay, S.J., Trauter, J., Smith, M.J., Koop, B.F. et Devlin, R.H. 2004. Evolution of duplicated growth hormone genes in autotetraploid salmonids fishes. Genome. 47: 714-723.

Meton, I., Caseras, A., Canto, E., Fernandez, F. et Baabante, I.V. 1999. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Journal of Nutrition. 130: 757-760.

Meton, I., Caseras, A., Canto, E., Fernandez, F. et Baanante, I.V. 2000. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regulatory-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). American Society for Nutritional Sciences. Research Communication: 757-760.

Miglavs, I. et Jobling, M. 1989. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth. Journal of Fish Biology. 34: 947-957.

Ng, T.B., Kwan, L.H.Y. et Cheng, C.H.K. 1994. Investigation of tissues from diverse teleosts for growth hormone and prolactin binding sites. Comparative Biochemistry and Physiology. 107A: 101-105.

Nicoll, C.S. 1975. Radioimmunoassay and radioreceptor assays for prolactin and growth hormone : a critical appraisal. American Zoologist. 15: 881-903.

Nicoll, C.S. 1981. Prolactin And Osmoregulation. Elsevier. New York.

Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M. et Karjalainen, J. 2004. Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. Aquaculture. 235: 285-296.

Oakley, T.H. et Phillips, R.B. 1999. Phylogeny of salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa. Molecular Phylogenetics and Evolution. 11: 381-393.

Ogasawara, T., Hirano, T., Akiyama, T., Arai, S. et Tagawa, M. 1989. Changes in plasma prolactin and growth hormone concentrations during freshwater adaptation of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) reared in seawater for a prolonged period. Fish Physiology and Biochemistry. 7: 309-313.

Peake, G.T., Morris, J. et Buckman, M.T. 1979. Growth hormone *Dans* Methods of hormone radioimmunoassay. Second Edition. Academic Press. NY. Pp 223- 244.

Pérez-Sanchez, J. 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. Fish Physiol. Biochem. 22: 135-144.

Pérez-Sanchez, J., Marti-Palanca, H. et Le Bail, P-Y. 1994a. Seasonal changes in circulating growth hormone (GH), hepatic GH-binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Fish Physiology and Biochemistry. 13: 199-208.

Pérez-Sanchez, J., Marti-Palanca, H. et Le Bail, P-Y. 1994b. Homologous growth hormone (GH) binding in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. Journal of Fish Biology. 44: 287-301.

Pérez-Sanchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubin de Celis, S., Gomez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A. et Valdivia, M.M. 2002. Overview of fish growth hormone family. New insight in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. Fish Physiology and Biochemistry. 27: 243-258.

Peter, R.E. 1986. Vertebrate neurohormonal system. *Dans* Pang, P.K.T. et Schreibman, M.P. Eds. Vertebrate Endocrinology : Fundamentals and Biochemical Implications. Vol.1. Academic Press. New York. Pp.57-102.

Peter, R.E. et Marchant, T.A. 1995. The endocrinology of growth in carp and related species. Aquaculture. 129: 299-321.

Pickford, G.E. et Atz, J.W. 1957. The physiology of the pituitary gland of fishes. New York Zoological Society. NY. Pp 84-99.

Pierce, A.L., Beckman, B.R., Shearer, K.D., Larsen, D.A. et Dickhoff, W.W. 2001. Effects of ration on somatotropic hormones and growth in coho salmon. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. 128: 255-264.

Pikal, M.J., Dellerman, K.M., Roy, M.L. et Riggin, R.M. 1991. The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone. Pharmaceutical Research. 8: 427-436.

Pitkänen, T., Krasnov, A., Teerijoki, H. et Mölsä, H. 1999. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Artic charr (*Salvenius alpinus*). I. Growth response to various GH constructs. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. 15: 91-98.

Plavnik, I. et Hurwitz, S. 1985. The performance of broiler chicks during and following a severe feed restriction at an early age. Poultry Science. 64: 348-355.

Pottinger, T.G., Rand-Weaver, M. et Sumpter, J.P. 2003. Overwintering fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. 136: 403-417.

Power, G. 1980. Chapter 3: The brook charr, *Salvelinus fontinalis Dans* Charrs, salmonid fishes of the genus *Salvelinus*. The Hague, The Netherlands.

Prince, T.J., Jungst, S.B. et Kuhlers, D.L. 1983. Compensatory responses to short-term feed restriction during the growing period in swine. Journal of Animal Science. 56: 846-852.

Rand-Weaver, M., Walther, B.T. et Kawauchi, H. 1989. Isolation and characterization of growth hormone from Atlantic cod (*Gadus morhua*). General and Comparative Endocrinology. 73: 260-269.

Rand-Weaver, M., Noso,T., et Kawauchi, H. 1991. The complete amino acid sequences of two variants of growth hormone from Atlantic cod. General and Comparative Endocrinology. 84: 182.

Refstie, T. et Kittelsen, A. 1976. Effect of density on growth and survival of artificially reared Atlantic salmon. Aquaculture. 8: 319- 326.

Rapport-Gratuit.com

Ricordel, M-J., Smal, J. et Le Bail, P-Y. 1995. Application of a recombinant cichlid growth hormone radioimmunoassay to measure native GH in tilapia (*Oreochromis niloticus*) bred at different temperatures. Aquatic Living Resources. 8: 153-160.

Roberts, S., Barry, T., Malison, J. et Goetz, F. 2004. Production of a recombinant derived growth hormone antibody and the characterization of growth hormone levels in yellow perch. Aquaculture. 232: 591-602.

Rubinsky, B. 2003. Principles of low temperature cell preservation. Heart Failure Reviews. 8: 277-284.

Russell, N.R. et Wooton, R.J. 1992. Appetite and growth compensation in European minnows (*Phoxinus phoxinus*) following short periods of food restriction. Environmental Biology and Fisheries. 34: 277-285.

Sahin, T., Akbulut, B. et Aksungur, M. 2000. Compensatory growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*). Turkish Journal of Zoology. 24: 81-86.

Sakamoto, T., Shepard, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman III, N. H., Bern, H.A. et Grau, E.G. 1997. Osmoregulation actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. General and Comparative Endocrinology. 106: 95-101.

Sangiao-Alvarellos, S., Miguez, J.M. et Soengas, J.L. 2005. Actions of growth hormone on carbohydrate metabolism and osmoregulation of rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*). General and Comparative Endocrinology. 141:214-225.

Santoso, U., Tanaka, K. et Ohtani, S. 1995. Early skip a day feeding of female broiler chicks fed light-protein realimentation diets. Performance and Body Composition. Poultry Science. 74: 494.

Schulga, A.A., Makarov, A.A., Levichkin, I.V., Belousova, Y.V., Lobachov, V.M., Protasevich, I.I., Pace, C.N. et Kirpichnikov, M.P. 2002. Increased stability of human

growth hormone with reduced lactogenic potency. Federation of European Biochemical Societies Letters. 528: 257-260.

Sekine, S., Mizukami, T., Saito, A., Kawauchi, H. et Itoh, S. 1989. Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon *Oncorhynchus keta*. Biochemica and Biophysica Acta. 1009: 117-120.

Singh, H. et Thomas, P. 1993. Mechanisms of stimulatory action of growth hormone on ovarian steroidogenesis in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. General and Comparative Endocrinology. 89: 341-353.

Skalski, G.T., Picha, M.E., Gilliam, J.F. et Borski, R.J. 2005. Variable intake, compensatory growth, and increased growth efficiency in fish: models and mechanisms. Ecology. 86: 1452-1462.

Soares, M.J. 2004. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. Reproductive Biology and Endocrinology. 2: 51.

Sohm, F., Manfroid, I., Pezet, A., Rentier-Delrue, F., Rand-Weaver, M., Kelly, P.A., Bœuf, G., Postel-Vinay, M.-C., de Luze, A. et Edery, M. 1998. Identification and modulation of a growth hormone-binding protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma during seawater adaptation. General and Comparative Endocrinology. 111: 216-224.

Sumpter, J.P.Le Bail P.Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G. et Carragher, J.F. 1991. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. General and Comparative Endocrinology. 83: 94-102.

Swift, D.R. 1961. The annual growth cycle in the brown trout *(Salmo trutta*) and its cause. Journal of Experimental Biology. 38: 595-604.

Swift, D.R. et Pickford, G.E. 1965. Seasonal variations in the growth hormone content of the pituitary gland of the perch, *Perca fluviatilis*. General and Comparative Endocrinology. 5: 354-365.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tian, X. et Qin, J.G. 2003. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. Aquaculture. 224: 169-179.

Tian, X. et Qin, J.G. 2004. Effects of previous ration restrictions on compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. Aquaculture. 235: 273-283.

Wagner, G.F. et McKeown, B.A. 1986. Development of a salmon growth hormone radioimmunoassay. General and Comparative Endocrinology. 62: 452-458.

Weigent, D.A. 1996. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. Pharmacological Therma. 69: 237-257.

Wilhelmi, A.E. 1955. International Symposium: *The hypophyseal growth hormone, nature and actions.* New York. McGraw-Hill.

Wood, P. 2001. Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization. Annals of Clinical Biochemistry. 38: 471-482.

Yada, T., Hirano, T. et Grau, E.G. 1994. Changes in plasma levels of the two prolactins and growth hormone during adaptation to different salinities in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. General and Comparative Endocrinology. 93: 214-223.

Yada, T., Azuma, T. et Takagi, Y. 2001. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. 129: 695-701.

Zhan, X., Giorgianni, F. et Desiderio, D.M. 2005. Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary. Proteomics. 5: 1228-1241.

Zhou, H., Jiang, Y., Ko, W.K.W., Li, W. et Wong, A.O.L. 2005. Paracrine regulation of growth hormone gene expression by gonadotrophin release in grass carp pituitary cells: functional implications, molecular mechanisms and signal transduction. Journal of Molecular Endocrinology. 34: 415-432.

Zhou, H., Ko, W.K.W., Ho, W.K.K., Stojilkovic, S.S. et Wong, A.O.L. 2004. Novel aspects of growth hormone (GH) autoregulation: GH-induced GH gene expression in grass carp pituitary cells through autocrine/paracrine mechanisms. Endocrinology. 145: 4615-4628.

Zhu, X., Cui, Y., Ali, M., et Wooton, R.J. 2001. Comparison of compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and minnow following similar food deprivation protocols. Journal of Fish Biology. 58: 1149-1165.

Zhu, X., Xie, S., Zou, Z., Lei, W., Cui, Y., Yang, Y. et Wootton, R.J. 2004. Compensatory growth and food consumption in gibel carp, *Carassius auratus gibelo*, and Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longrostris*, experiencing cycles of feed deprivation and re-feeding. Aquaculture. 241: 235-247.