

## RECHERCHE ET CARACTERISATION D'IMMUNOGLOBULINES DANS LES OEUFS DU LOUP (*Dicentrarchus labrax*)

J. F. PEPIN\*, G. BREUIL\*, P. RIGOBERT\*\* et B. ROMESTAND\*\*

### RESUME:

Chez le loup (*Dicentrarchus labrax L.*), l'existence d'un transfert d'immunité maternelle a été étudiée par ELISA et immunotransfert. Les protéines extraites d'oeufs fécondés ont été analysées afin de déterminer la présence éventuelle d'immunoglobulines (Ig). Après essais de plusieurs protocoles d'extraction (précipitations, chromatographies), l'utilisation de sondes anticorps monoclonales et polyclonales spécifiques des Ig sériques du loup a permis de confirmer la présence d'une protéine de type Ig en très faible quantité dans les oeufs. Leur caractérisation biochimique a été réalisée par électrophorèse en gel dénaturant SDS. Les résultats indiquent que ces Ig ont un poids moléculaire de 206 kDa. Leur poids moléculaire est inférieur à celui de l'IgM sérique qui est d'environ 800 kDa. La chaîne lourde (H) et la chaîne légère (L) des Ig de l'oeuf ou des IgM sériques ont des poids moléculaires similaires de 75 kDa et de 28 kDa, respectivement. Ces données suggèrent que la structure de l'Ig d'oeuf de loup est monomérique. Cette Ig pourrait dériver de sous-unités de l'immunoglobuline sérique qui est tétramérique.

\*Unité Immuno-Pathologie, IFREMER GIE-RA, Chemin de Maguelone, F - 34250 Palavas-les-Flots.

\*\*Laboratoire de Parasitologie et Immunologie, Université Montpellier II, F-34095 F- Montpellier Cedex 05

## ABSTRACT:

The occurrence of maternal immunity transfer in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) was investigated using ELISA and Western blot technics. In order to determine the possible presence of immunoglobulin (Ig), egg proteins obtained from fertilized eggs were analyzed. After several extraction protocol assays (precipitation, chromatography), monoclonal and polyclonal antibody probes specific to Sea bass Ig allowed to confirm the presence of an immunoglobulin-like protein in eggs with very low level. Biochemical characterization was carried out using SDS-PAGE. Results indicated that egg Ig had a molecular weight of 206 kDa. They were smaller than seric IgM (800 kDa). The heavy (H) and light (L) chains of the egg Ig and of the seric IgM had similar molecular weight, 75 kDa and 28 kDa, respectively. These data suggest that egg Ig of Sea bass have monomeric structure. We hypothesize they could be sub-unit from the tetrameric IgM.

## INTRODUCTION :

Tout comme les Mammifères et les Oiseaux, les Poissons possèdent un système de défense immunitaire. La réponse humorale spécifique chez les vertébrés supérieurs est liée notamment à la production par les lymphocytes de protéines appelées immunoglobulines (Ig). Chez les Téléostéens, de telles protéines existent, cependant un seul isotype a été à ce jour identifié: il s'agit d'une Ig classée comme une "IgM" en raison de sa ressemblance avec l'IgM des Mammifères (SHELTON et SMITH, 1970 ; CHARLEMAGNE, 1990 ; FUDA et Coll., 1992). Plusieurs auteurs ont déjà démontré pour différentes espèces de poissons, l'existence du transfert d'une activité anticorps ou d'Ig, de la mère dans les oeufs (BLY et Coll., 1986 ; MOR et AVTALION, 1988 ; FUDA et Coll., 1992 ; HAYMAN et LOBB, 1993).

L' IgM sérique du loup, *Dicentrarchus labrax*, a été récemment caractérisée comme une protéine tétramérique d'environ 800 kDa (BOURMAUD, 1994 ; BOURMAUD et Coll., 1995). Sa purification a permis la production de sondes anticorps polyclonales (SAP) et monoclonales (SAM) spécifiquement dirigées contre les "IgM" du loup (ROMESTAND et Coll., 1995). Notre étude a consisté à rechercher l'existence d'Ig dans les oeufs du loup au moyen de ces sondes anticorps et d'en comparer les caractéristiques à celles de l'Ig sérique de l'adulte, afin de mieux préciser l'existence d'un transfert d'immunité passive dans les oeufs pour cette espèce.

## MATERIELS ET METHODES :

### **Collecte et préparation des oeufs de loup :**

Les oeufs ont été obtenus à la station IFREMER de Palavas (Hérault-France). Ils sont issus d'un lot de géniteurs, loups adultes de plus de trois ans élevés en captivité, selon un cycle naturel de ponte, c'est-à-dire selon une photopériode et une température de l'eau

conformes aux saisons. Les oeufs récoltés le jour même de la ponte sont déposés sur un tamis (maille de 800  $\mu\text{m}$ ) et rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée afin d'éliminer au maximum les fluides ovariens ainsi que les débris organiques étrangers. Les oeufs ont une taille d'environ 1100  $\mu\text{m}$ . Ils sont égouttés puis conservés à  $-24^{\circ}\text{C}$  jusqu'à préparation des extraits solubles.

Cette étape consiste à broyer et à homogénéiser des oeufs dans du tampon phosphate PBS pH 7,2 (1vol/3vol), à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce puis d'un Potter ou à l'aide d'un ultra-broyeur rotatif Polytron. L'extrait obtenu est clarifié par centrifugation (4000g, 15min), le culot et la couche lipidique de surface sont éliminés conformément au protocole décrit par MOR et AVTALION (1990). Le surnageant constitue l'extrait soluble brut (ESB), il est également conservé à  $-24^{\circ}\text{C}$ . Le témoin IgM correspond au sérum d'un loup prélevé par ponction au niveau du sinus cardiaque. Le témoin négatif est constitué par un extrait d'oeufs de daurade *Sparus aurata*.

### Essais de purification des Ig à partir de l'ESB

Avant cette étape, des immunodosages ont permis de révéler la présence d' « Ig » dans l'ESB, cependant leur caractérisation biochimique n'a pu se faire sans purification. La difficulté majeure de cette étude réside en effet dans l'extrême faiblesse de la teneur en Ig des oeufs de poisson en général (FUDA et Coll., 1992), aussi plusieurs protocoles d'extraction et de concentration ont dû être mis en oeuvre. Parmi ceux-ci, l'extraction de la fraction lipidique du vitellus par précipitation au sulfate de dextran selon HAYMAN et LOBB (1993) et l'extraction des euglobulines par précipitation acide, n'ont pas donné les résultats escomptés et ne seront pas présentés.

*-Extraction des Ig par chromatographie échangeuse d'ions.* En se référant au point isoélectrique de l'IgM sérique préalablement déterminé par isoélectrofocalisation (BREUIL G., communication personnelle), la technique de chromatographie échangeuse d'ions a été mise en oeuvre pour essayer d'extraire les Ig des oeufs. Ainsi, par utilisation du système Gradifrac (Pharmacia, Uppsala, Suède), une colonne chargée de 40 ml de gel Sépharose est équilibrée par du tampon Tris-Hcl 10 mM, pH 8,5. L'échantillon, 30 ml d'ESB, est déposé. Après son passage sur la colonne, l'élution est réalisée par un tampon Tris-Hcl 10 mM + Nacl 1 M, pH 8,5 délivré graduellement (5%...100%). Les fractions collectées sont analysées par la technique ELISA.

*-Précipitation des Ig par le sulfate d'ammonium.* Selon HAYMAN et Coll. (1993), 18,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont ajoutés à 48,4 ml d'ESB afin d'obtenir une solution à 50% de la saturation en sel. La solution est agitée 30 min. à température ambiante. Après centrifugation, seul le culot est conservé et remis en suspension avec du PBS, puis dialysé contre du PBS à  $4^{\circ}\text{C}$  plusieurs jours. En fin de dialyse, une mesure de densité optique (DO) est pratiquée (Abs 280nm x1.55 - Abs 260x0.76) afin d'avoir une approximation de la teneur en protéines totales (LANE, 1988). Cette mesure est faite après chaque étape de l'extraction. Par ultrafiltration sur membrane (Filtron, seuil de coupure 30 kDa), la concentration en protéines est ajustée à 3,8 mg/ml environ.

## **Immunodosage des Ig par ELISA dans les extraits d'oeufs :**

Le dosage ELISA mis en oeuvre a une configuration de type sandwich SAP-SAM. La sonde polyclonale lapin anti-IgM de loup est utilisée comme capteur, la sonde anticorps monoclonale biotinylée (SAM 6 E11) est spécifique de l'IgM du loup et est utilisée comme anticorps traceur (ROMESTAND et Coll., 1995; BREUIL et Coll., 1996). Le dosage des échantillons est effectué par comparaison à un sérum de loup de référence.

## **Caractérisation biochimique des extraits d'oeufs par électrophorèses :**

Avant chaque électrophorèse la concentration en protéines totales des échantillons est déterminée par la technique de BRADFORD (1976). Les protéines sont colorées après fixation à l'acide acétique par le bleu de Coomassie.

*Electrophorèse en gel non dénaturant* : Afin de déterminer le poids moléculaire des protéines natives dans les extraits, plusieurs fractions sont analysées sur gel de polyacrylamide. Les analyses sont effectuées sur des gels en gradient de polyacrylamide 4-15% et 8-25% (PhastSystem - Pharmacia, Uppsala, Suède ).

*Electrophorèse en gel dénaturant, PAGE SDS* : Les gels utilisés sont également des gradients de polyacrylamide 4-15% et 8-25% (Pharmacia ou Novex, San Diego, USA).

## **Etude des Ig de l'oeuf par immunotransfert :**

La technique d'immunotransfert est appliquée aux protéines extraites à partir de l'ESB après séparation électrophorétique en condition dénaturante, sur gel de polyacrylamide .

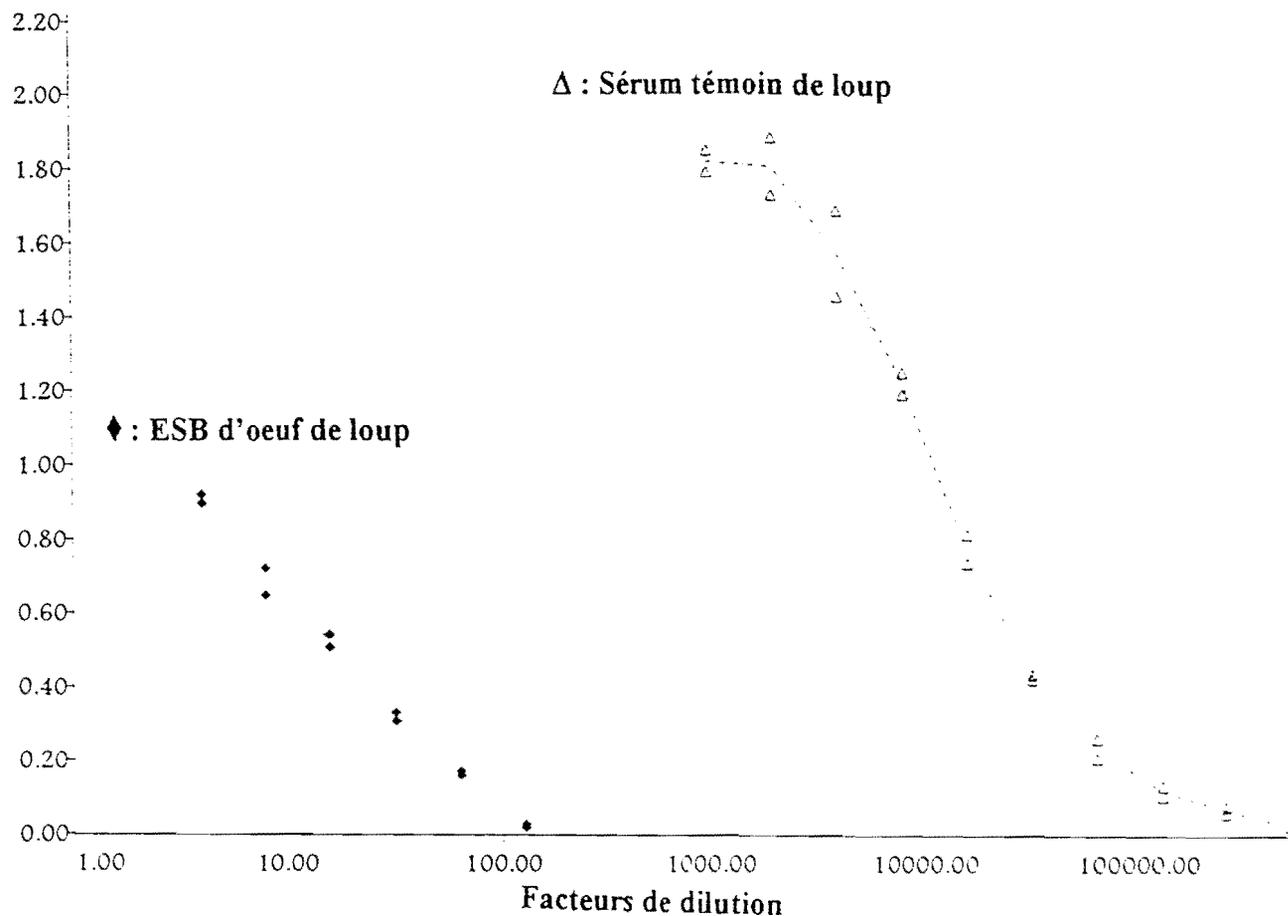
Les sondes SAP et SAM sont utilisées, pour la détection des Ig après transfert sur membrane PVDF (Poly Vinyl Di-Fluorure) selon, ROMESTAND et Coll. (1995).

## **RESULTATS:**

### **Dosage des Ig par ELISA :**

Des valeurs de D.O. significatives ( $> 0,6$  avec un non spécifique de 0,01) ont été obtenues pour le dosage de l'ESB, sur trois fractions du troisième pic du chromatogramme ainsi que pour le dosage de l'ESB après précipitation au sulfate d'ammonium. L'ELISA révèle la présence d'une protéine réagissant avec les sondes anticorps, alors que le témoin « daurade » est toujours négatif. Le but de ces analyses est d'ordre qualitatif, cependant les valeurs obtenues permettent de déterminer une concentration en Ig dans les oeufs aux environs de 4ng / mg, soit 4 ng par oeuf (Fig. 1).

DO à 490 nm



**Figure 1:** Test en dilution par ELISA de type sandwich des Ig contenues dans le sérum de contrôle du loup (10mg/ml) et dans l'ESB (non spécifique déduit)

#### Analyse des Ig par électrophorèses :

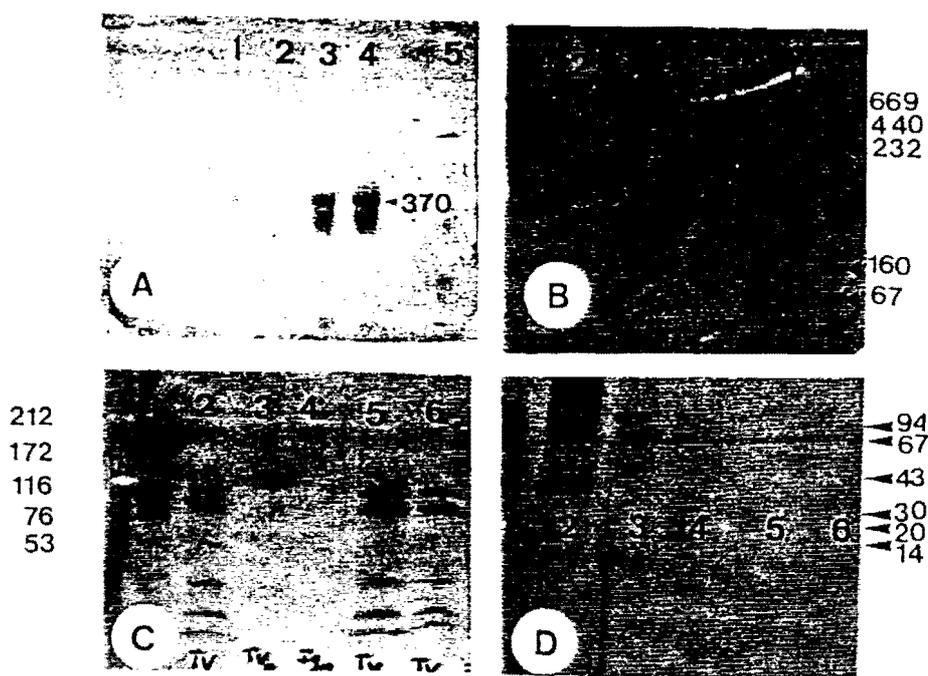
Les électrophorèses PAGE native (Fig. 2 et 3) de l'ESB laissent apparaître deux fractions de 500 et 370 kDa qui pourraient correspondre à la vitellogénine et à la lipovitelline. Les fractions purifiées par chromatographie et classées Ig+ après ELISA, mélangées et concentrées par ultrafiltration (16mg/ml), laissent apparaître par électrophorèse une seule fraction de poids moléculaire d'environ 360 kDa. Le profil de l'extrait purifié par précipitation est semblable au précédent.

Les électrophorèses en gel dénaturant PAGE-SDS (Fig. 4) font apparaître cinq fractions, aussi bien pour l'ESB réduit que non réduit : 117, 72, 27 kDa, et deux bandes de P.M. inférieurs, hors de la droite établie à partir du marqueur de P.M. (212, 170, 116, 76, 53 kDa). Les extraits purifiés par chromatographie ou par précipitation présentent exactement les mêmes profils électrophorétiques, après réduction ou non au  $\beta$ -mercaptoéthanol.

### Mise en évidence des Ig par immunotransfert :

Au cours de ces essais, les expériences d'immunotransfert réalisées sur l'IgM de loup purifiée ou sur le sérum de loup avec la sonde polyclonale lapin anti-IgM de loup nous ont permis de caractériser une ou plusieurs fractions positives dont les P.M. étaient de l'ordre de 240-200 kDa, 80-72 kDa, 27 kDa avec la sonde polyclonale. Le témoin négatif constitué par l'extrait soluble d'oeuf de daurade n'a lui jamais réagi avec aucune des deux sondes. Les multiples essais pratiqués à partir de l'ESB n'ont pas permis de mettre en évidence une fraction correspondant à l'Ig. Ceci aussi bien sur les gels 4-15% que sur les gels 8-25%, avec des dépôts d'échantillons de 4 ou 20 µl, avec ou sans β-mercaptoéthanol.

L'immunotransfert pratiqué à partir du mélange des fractions obtenues par chromatographie n'a pas permis d'observer de signal positif. Les différents essais effectués sur l'extrait purifié par précipitation ont donné un signal positif avec les deux sondes SAP et SAM, sur l'échantillon réduit ou non. Dans nos expériences, à une exception près, le signal coloré en brun apparaît lentement, en moins d'une demi-heure, probablement en raison de la faible teneur en Ig des extraits et s'efface en 24 heures, la réaction étant certainement instable. Les fractions protéiques révélées ont des valeurs de P.M. de l'ordre de : 200, 110, et 85-75 kDa (Fig. 5).



**A - Figure 2 :** Electrophorèse PAGE native, gel 4-15 %;

1: sérum de loup précipité ; 2: sérum de loup ; 3: extrait soluble d'oeuf précipité ; 4: extrait soluble d'oeuf brut ; 5: marqueur de poids moléculaire.

**B - Figure 3 :** Electrophorèse PAGE native , gel 8-25 %;

1: IgM de loup purifiée ; 2: ESB de daurade précipité ; 3: ESB de daurade ; 4: ESB précipité ; 5: ESB ; 6: sérum de loup ; 7: sérum de loup précipité ; 8: marqueur de poids moléculaire.

**C - Figure 4 :** Electrophorèse en PAGE-SDS, gel 4-15 %;

1: marqueur de P.M; 2: ESB; 3: ESB réduit; 4: IgM de loup réduite; 5: ESB; 6: ESB réduit.

**D - Figure 5 :** Immunoempreinte ,

1: sérum de loup réduit; 2: sérum de loup; 3: ESB réduit; 4: ESB; 5: ESB de daurade; 6: marqueur de P.M.

## DISCUSSION - CONCLUSION :

Ce travail a permis de mettre en évidence dans les oeufs de loup une substance réagissant de manière identique à l'IgM sérique. Nous référant aux travaux de AVTALION et MOR (1992), nous avons utilisé la technique de l'ELISA pour doser les Ig dans les oeufs. Chez le tilapia, *Sarotherodon galilaeus*, ces auteurs ont mis en évidence l'existence d'une communauté antigénique entre les Ig sériques de la mère et les Ig dans les oeufs. De même, notre dosage ELISA couplé à la sonde monoclonale biotinylée s'est révélé assez performant pour détecter des quantités infimes d'immunoglobulines dans les oeufs (< à 4ng/mg), même sans purification ou concentration de l'échantillon. Le fait que le SAM 6E11 reconnaisse un épitope de la chaîne lourde des IgM de loup (BOURMAUD, 1994; ROMESTAND et Coll., 1995) a permis ainsi de doser une molécule qui s'est révélée de structuré différente de l'IgM sérique, mais possédant vraisemblablement une chaîne lourde du même type ou un domaine conservé de l'épitope.

Les données obtenues par électrophorèses n'ont pas permis de mettre directement en évidence les Ig présentes dans les oeufs. La première raison est sûrement liée à la très faible teneur en Ig des extraits malgré les purifications essayées. De plus, la coloration au bleu de Coomassie ne révèle les protéines après migration qu'au seuil de 1µg. La deuxième raison peut être due à la très grande quantité de lipovitelline, dérivée majeure de la vitellogénine, dont les nombreuses sous-unités ont un P.M. compris entre 370 et 25 kDa (WALLACE, 1985), "masquant" certainement les fractions immunoglobuliniques.

Les résultats des immunotransferts nous ont permis de confirmer la présence d'Ig dans les oeufs et d'en déduire leur poids moléculaire et leur structure. Les trois fractions réagissant avec les sondes anticorps ont des valeurs de P.M. de 200 kDa, 110 kDa, et 85-75 kDa. Il est à noter que la coloration au rouge Ponceau, révélant les protéines sur les membranes de transfert, n'a jamais coloré les bandes ayant réagi avec les sondes, toujours pour des raisons de concentration probablement. Les échantillons réduits ou non, ont donné sensiblement les mêmes résultats. Cette donnée est peut-être en relation avec la grande fragilité de la molécule étudiée (AVTALION et MOR, 1992).

Sur la base des poids moléculaires calculés, nous proposons de caractériser la molécule mise en évidence par les sondes comme une immunoglobuline de structure monomérique d'environ 206 kDa, avec deux chaînes lourdes (H) d'environ 75 kDa et deux chaînes légères (L) de 28 kDa. Les échantillons réduits et soumis à la sonde SAP n'ont pas permis d'observer de fraction correspondant à la chaîne légère, cependant son poids est estimé à partir du calcul basé sur les P.M. des sous-unités de la molécule à structure monomérique et en se référant également au P.M. de la chaîne légère de l'IgM sérique. La fraction ayant un P.M. de 110 kDa pourrait correspondre à une demi molécule (75kDa + 28kDa). Cette immunoglobuline diffère sensiblement de l'IgM sérique qui est tétramérique et qui présente une valeur de P.M. de l'ordre de 800 kDa, avec huit chaînes H ayant un P.M. unitaire de 75 kDa et huit chaînes L ayant un P.M. unitaire de 28 kDa. Nos résultats sont en accord avec les travaux de AVTALION et MOR (1992) sur le tilapia et avec ceux de YOUSIF et Coll. (1995) sur le saumon coho. Ils confirment le transfert d'une immunité passive néonatale chez le loup par passage d'une immunoglobuline monomérique dans les

oeufs. Cette Ig pourrait être une sous unité de l'IgM tétramérique, scindée en monomères, afin de faciliter son passage dans les ovocytes et de conférer à l'oeuf puis à l'embryon une immuno-protection passive transitoire.

#### REMERCIEMENTS :

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une U.R.M., Unité mixte de Recherche Marine N°1, intitulée « L'Immunologie du loup », financé en partie par l'IFREMER et avec la collaboration de l'Université Montpellier II.

## BIBLIOGRAPHIE :

- AVTALION R. R. et MOR A., 1992. Monomeric IgM is transferred from mother to egg in tilapias. *Bamidgeh* **44**, 93-98.
- BLY J. E., GRIMM A. S. et MORRIS I. G., 1986. Transfer of passive immunity from mother to young in a teleost fish : Hemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **84A**, 309-313.
- BOURMAUD C., 1994. Production de sondes monoclonales anti-immunoglobulines de loup (*Dicentrarchus labrax*) : intérêt en immunologie fondamentale et appliquée. Thèse doct. Montpellier I, 254p.
- BOURMAUD C., ROMESTAND B. et BOUIX G., 1995. Isolation and partial characterisation of IgM-like seabass (*Dicentrarchus labrax*) immunoglobulins. *Aquaculture*, **132**, 53-58.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye-binding. *Anal. biochem.*, **72**, 248-254.
- BREUIL G., VASSILOGLOU B., PEPIN J.F. et ROMESTAND B., 1996. Ontogeny of IgM bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunol.*, sous presse.
- CHARLEMAGNE J., 1990. Immunologie des Poissons. *Immunologie animale*, éd. Flammarion, 427-444.
- FUDA H., HARA A., YAMAZAKI F. et KOBAYASHI K., 1992. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Dev. Comp. Immunol.*, **16**, 415-423.
- HAYMAN J. R. et LOBB C. J., 1993. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 241-248.
- LANE D., 1988. *Antibodies, a laboratory manual*, Ed Harlow, 673p.
- MOR A. et AVTALION R. R., 1988. Evidence of transfer of immunity from mother to eggs in tilapias. *Bamidgeh* **40**, 22-28.
- MOR A. et AVTALION R. R. 1990. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapias. *J. Fish Biol.*, **37**, 249-255.
- ROMESTAND B., BREUIL G., BOURMAUD C., COEURDACIER J.L. et BOUIX G., 1995. Development and characterization of monoclonal antibodies against seabass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758. *Fish and Shellfish Immunol.*, **5**, 347-357.
- SHELTON E. et SMITH M., 1970. The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin : a tetrameric macroglobulin, *J. Mol. Biol.*, **54**, 615.
- WALLACE R.A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non mammalian vertebrates. In : *Dev. Biol.*, (L.W. Bowder, ed.), Plenum Publishing Corporation, New York, 127-177.
- YOUSIF A.N., ALBRIGHT L.J. et EVELYN, T.P.T., 1995. Immunological evidence for the presence of an IgM-like immunoglobulin in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 109-114.