

Essai de castration immunologique du porc mâle par un vaccin aqueux synthétique

M. BONNEAU et C. CARELLI *

avec la collaboration technique de Françoise GIOVANNI, Anne-Marie MOUNIER
et Y. PEIGNIER

INRA, Station de Recherches porcines
Centre de Recherches de Rennes
Saint-Gilles, F 35590 L'Hermitage

* Immunothérapie expérimentale, Institut Pasteur,
28, rue du D^r Roux, F 75724 Paris Cedex 15

Résumé

Un essai d'immunisation active anti-LHRH a été réalisé sur 30 verrats, à l'aide d'un adjuvant d'immunisation utilisable en phase aqueuse : le MDP. Dans les conditions expérimentales utilisées, aucune présence d'anticorps n'a pu être décelée chez les animaux ayant reçu les préparations immunogènes. En conséquence, ni le développement de l'appareil génital, ni les teneurs en androsténone du tissu adipeux n'ont été significativement réduits par l'administration d'immuno-gène.

Mots clés : LHRH, immunisation active, porc, développement sexuel, stéroïdes.

I. Introduction

Le blocage des productions de stéroïdes chez le porc mâle, quelques semaines avant l'abattage, permettrait d'éviter les problèmes liés à l'accumulation d'androsténone (5 α -androst-16-ène-3-one), responsable des défauts d'odeur sexuelle des viandes de verrats (PATTERSON, 1968 ; BONNEAU, 1982). On sait, en effet, qu'après castration chirurgicale des verrats, la teneur en androsténone du tissu adipeux chute rapidement, avec une demi-vie apparente d'environ une semaine (BONNEAU *et al.*, 1982).

La synthèse testiculaire de stéroïdes est contrôlée par l'hormone hypophysaire LH dont la production est elle-même gouvernée par l'hormone hypothalamique LHRH. L'immunisation active contre le LHRH a été utilisée avec succès pour réduire la synthèse de stéroïdes chez un certain nombre d'espèces (CHAFFAUX *et al.*, 1985^a) et en particulier chez la truie (ESBENSHADE & BRITT, 1985) ou le vertrat (FALVO *et al.*, 1986). Nous avons pu nous-même vérifier l'efficacité de ce traitement chez le porc mâle afin de réduire la teneur en androsténone du tissu adipeux jusqu'à des niveaux très faibles, comparables à ceux observés chez les mâles castrés ou les femelles (CARATY & BONNEAU, 1986). Cependant, l'adjuvant de Freund complet, qui a servi d'adjuvant d'immunisation au cours de ces essais, n'est pas utilisable dans la pratique de l'élevage

(CHAFFAUX *et al.*, 1985^a). En effet, ce dernier entraîne la formation d'abcès froids caséux aux points d'injection. De plus, les suspensions de mycobactéries rendent les animaux positifs à l'épreuve d'intradermo-tuberculation. Par contre, un autre adjuvant d'immunisation, totalement synthétique, le N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (Muramyl dipeptide ou MDP), peut être employé (ELLOUZ *et al.*, 1974 ; CHEDID *et al.*, 1978). Le couplage direct par liaison covalente au LHRH d'un dérivé du MDP, le MDP-Lysine, sans l'intermédiaire d'une molécule porteuse (porteur) a permis d'obtenir un immunogène capable d'induire des anticorps anti-LHRH établissant une castration immunologique chez la souris mâle (CARELLI *et al.*, 1982).

Le but de notre expérience a été de tester l'efficacité de cet adjuvant afin de créer une immunisation active contre le LHRH chez le porc mâle et en mesurer les conséquences sur le développement de l'appareil génital et l'évolution des teneurs en androsténone du tissu adipeux.

II. Matériel et méthodes

Deux expériences ont été successivement effectuées. Dans la première, 15 verrats de race Large White, issus de 5 portées, ont été répartis entre les 3 traitements suivants :

- « Témoins » : animaux témoins ne recevant aucune injection d'immunogène ;
- « MDP-0.3 » : animaux recevant des injections sous-cutanées de LHRH couplé au MDP-lysine en solution physiologique (CARELLI *et al.*, 1982), à raison de 0,3 mg d'équivalent LHRH par injection ;
- « MDP-1.0 » : animaux recevant des injections du même produit dans les mêmes conditions, à raison de 1 mg d'équivalent LHRH par injection.

Le rendement de couplage du LHRH a été mesuré grâce à un standard interne (LHRH marqué) et au dosage direct de l'acide muramique selon REISSING *et al.* (1956). L'immunogène LHRH-Lysine-MDP a été testé vis-à-vis de la LHRH. Il entraîne l'inhibition à 100 % de sa liaison bien qu'avec une affinité inférieure à celle du LHRH natif (HOSMALIN *et al.*, 1987).

Une injection d'immunogène a été pratiquée à 13, 14, 15 et 24 semaines d'âge et des prises de sang faites à 16, 19, 24, 28 et 32 semaines d'âge pour la recherche d'anticorps spécifiques anti LHRH. Des biopsies de tissu adipeux sous-cutané dorsal ont été effectuées à 24, 28 et 32 semaines d'âge pour en déterminer la teneur en androsténone, selon une méthode décrite par UZU & BONNEAU (1980). A 32 semaines d'âge, les animaux ont été abattus, l'appareil génital disséqué, et ses différentes composantes pesées.

Dans la seconde expérience, 15 verrats de race Large White ont été répartis entre les 3 traitements suivants :

- « Témoins » : animaux ne recevant aucune injection d'immunogène ;
- « MDP-1.5 » : animaux recevant des injections sous-cutanées de LHRH couplé à la thyroglobuline, selon CHAFFAUX *et al.* (1985^b), et associé au MDP, à raison de 1.5 mg d'équivalent LHRH et 6 mg de MDP par injection ;
- « MDP-SQUA » : animaux recevant des injections sous-cutanées du même

produit, aux mêmes doses, en émulsion dans le squalane à 50 %. Le squalane (Perhydrosqualène) est une huile métabolisable déjà utilisée dans la pharmacopée.

Une injection d'immunogène a été pratiquée à 22, 23, 24 et 27 semaines d'âge, les anticorps sériques recherchés, et la teneur en androsténone du tissu adipeux a été mesurée à 27, 31, 36, 40 et 45 semaines d'âge. Le développement de l'appareil génital a été déterminé à 45 semaines d'âge.

La recherche des anticorps spécifiques anti-LHRH a été réalisée selon CARELLI *et al.* (1982) par incubation des sérums avec le traceur iodé (^{125}I -LHRH). Du sérum normal (non immun) a été incubé dans les mêmes conditions afin de déterminer la liaison non spécifique. L'absence d'anticorps anti-MDP a été contrôlée dans les sérums des animaux immunisés par LHRH-Lysine-MDP. Les anticorps anti-MDP n'ont pas été recherchés sur les animaux immunisés par thyroglobuline-LHRH associée au MDP, le muramyl dipeptide libre ne pouvant pas être immunogène (CARELLI, données non publiées).

III. Résultats et discussion

Aucune présence d'anticorps spécifique anti-LHRH n'a été décelée dans le sérum des animaux ayant reçu les injections d'immunogène. En conséquence, ni la croissance de l'appareil génital (tabl. 1) ni les teneurs en androsténone du tissu adipeux (tabl. 2)

TABLEAU 1

Développement de l'appareil génital à l'abattage (moyennes \pm e.t.m.).
Genital tract development at slaughter (means \pm s.e.m.).

	Testicules <i>Testes</i> (g)	Epididymes <i>Epididymis</i> (g)	Vésicules séminales <i>Seminal vesicles</i> (g)	Glandes bulbourethrales <i>Bulbourethral glands</i> (g)
Expérience 1 <i>Experiment 1</i>				
Témoins <i>Control</i>	673 ^b \pm 23	150 \pm 8	694 \pm 100	309 \pm 42
MDP-0.3	725 ^b \pm 49	173 \pm 17	585 \pm 149	286 \pm 44
MDP-1.0	856 ^a \pm 38	191 \pm 16	443 \pm 121	325 \pm 30
Expérience 2 <i>Experiment 2</i>				
Témoins <i>Control</i>	830 \pm 50	178 \pm 9	539 \pm 89	416 \pm 55
MDP-1.5	786 \pm 47	190 \pm 16	536 \pm 38	360 \pm 35
MDP-SQUA . . .	862 \pm 77	194 \pm 23	493 \pm 65	394 \pm 46

Les moyennes d'une même colonne, affectées de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil 5 %.
Within rows, means with unlike superscripts are significantly different (P < 0.05).

TABLEAU 2

*Evolution de la teneur en androsténone du tissu adipeux (moyennes \pm e.t.m. ; ug/g).
Fat androstenone levels (means \pm s.e.m. ; ug/g).*

	Temps après la première immunisation (semaines) <i>Time after the first immunization (weeks)</i>					
	11		15		19	
Expérience 1 <i>Experiment 1</i>						
Témoins <i>Control</i>	0.67 ^b \pm 0.11		1.58 \pm 0.38		3.88 \pm 0.52	
MDP-0.3	1.12 ^a \pm 0.24		1.67 \pm 0.52		4.11 \pm 1.23	
MDP-1.0	0.53 ^b \pm 0.17		1.50 \pm 0.64		2.47 \pm 0.67	
Expérience 2 <i>Experiment 2</i>	0	5	9	14	18	23
Témoins <i>Control</i>	0.37 \pm 0.07	0.86 \pm 0.28	1.07 \pm 0.49	0.87 \pm 0.20	2.41 \pm 0.54	3.59 \pm 0.63
MDP-1.5	0.41 \pm 0.09	1.36 \pm 0.72	1.52 \pm 0.63	1.70 \pm 0.47	1.93 \pm 0.44	2.69 \pm 0.49
MDP-SQUA . . .	0.41 \pm 0.08	0.52 \pm 0.11	0.97 \pm 0.40	1.19 \pm 0.41	1.29 \pm 0.28	2.84 \pm 1.01

Les moyennes d'une même colonne, affectées de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil 5 %.
Within row, means with unlike superscripts are significantly different (P < 0.05).

n'ont été significativement réduits par les traitements expérimentaux. Dans l'expérience 1, une augmentation paradoxale des teneurs en androsténone, 11 semaines après la 1^{re} immunisation, est observée dans le groupe MDP-0,3 par rapport aux 2 autres lots (Témoins et MDP-1,0). A l'abattage, le poids testiculaire est significativement plus élevé dans le groupe MDP-1,0 que dans les 2 autres lots d'animaux. Ces observations sont à relier à l'hyperproduction de stéroïdes avec hypertrophie des cellules de Leydig obtenues transitoirement en début de période d'immunisation chez la souris (CARELLI, résultats non publiés).

Ainsi, dans les conditions employées, qu'il soit couplé au LHRH ou qu'il serve seulement d'adjuvant d'immunisation au LHRH couplé à la thyroglobuline, le MDP n'a pas permis d'obtenir la production d'anticorps spécifique anti-LHRH chez le porc, contrairement aux résultats positifs obtenus chez la souris (CARELLI *et al.*, 1982). La réalisation d'une émulsion huile-dans-l'eau avec le squalane n'améliore pas le pouvoir immunogène des préparations injectées. L'absence de réponse immunitaire ne peut pas être imputée à une insuffisance des doses administrées (de 0,3 à 1,5 mg d'équivalent LHRH par injection). En effet, dans un précédent essai (CARATY & BONNEAU, 1986), nous avons pu obtenir chez le verrat des titres élevés d'anticorps anti-LHRH et une chute spectaculaire des teneurs en androsténone du tissu adipeux avec des doses de 0,25 mg d'équivalent LHRH couplé à la BSA et administré en émulsion dans l'adjuvant de Freund complet. L'absence de production d'anticorps est probablement due à une variation interspécifique de la réponse immunitaire au MDP. Cependant, bien que les couplages aient été effectués selon des protocoles déjà utilisés pour d'autres expériences (CHAFFAUX *et al.*, 1985^b), on ne peut pas exclure totalement la possibilité d'une qualité insuffisante des préparations immunogènes utilisées.

Reçu en février 1987.

Accepté en mai 1987.

Summary

Tentative immunocastration of male pigs with a synthetic aqueous vaccine

Two experiments were carried out in a total of 30 boars to assess the efficiency of a synthetic adjuvant (Muramyl dipeptide or MDP) to achieve active immunization against the hypothalamic hormone LHRH. In our experimental conditions, no specific serum anti-LHRH antibodies were found in animals given the immunogenic preparations. Therefore, neither male genital tract development (tabl. 1), nor fat androstenone levels (tabl. 2) were significantly reduced by the injection of vaccine. The lack of LHRH-antibody production was probably the result of species differences in the immunological response to MDP.

Key words : LHRH, active immunization, pig, sexual development, steroid.

Références bibliographiques

- BONNEAU M., 1982. Compounds responsible for boar taint, with special emphasis on androstenone : a review. *Livest. Prod. Sci.*, **9**, 687-705.
- BONNEAU M., MEUSY-DESSOLLE N., LEGLISE P.C., CLAUS R., 1982. Relationships between fat and plasma androstenone and plasma testosterone in fatty and lean young boars following castration. *Acta Endocrinol. Copenhagen*, **101**, 129-133.
- CARATY A., BONNEAU M., 1986. Immunisation active du porc mâle contre la gonadolibérine : effets sur la sécrétion d'hormones gonadotropes et sur la teneur en 5 α -androst-16-ène-3-one du tissu adipeux. *C.R. Acad. Sci. Paris-Série D*, **303**, 673-676.
- CARELLI C., AUDIBERT F., GAILLARD J., CHEDID L., 1982. Immunological castration of male mice by a totally synthetic vaccine administered in saline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 5392-5395.
- CHAFFAUX S., CROCHOT C., DE HAAS V., DELETANG F., 1985^a. Castration immunologique des mammifères par immunisation active avec de la gonadolibérine. *Rech. Med. Vet.*, **161**, 133-145.
- CHAFFAUX S., CROCHOT C., CARELLI C., DELETANG F., 1985^b. Immunisation active anti-gonadolibérine chez le bélier pré-pubère. *Recueil de Méd. Vét.*, **161**, 335-341.
- CHEDID L., AUDIBERT F., JOHNSON A.G., 1978. Biological activities of muramyl dipeptide, a synthetic glycopeptide analogous to bacterial immunomodulating agents. *Progress in Allergy*, **25**, 63-105.
- ELLOUZ F., ADAM A., CIORBARU R., LEDERER E., 1974. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **59**, 1317-1325.
- ESBENSHADE K.L., BRITT J.H., 1985. Active immunization of gilts against Gonadotropin releasing hormone : effects on secretion of gonadotropins, reproductive function and response to agonists of gonadotropin releasing hormone. *Biol. Reprod.*, **33**, 569-577.
- FALVO R.E., CHANDRASHEKAR V., ARTHUR R.D., KUENSTLER A.R., HASSON T., AWONIYI C., SCHANBACHER B.D., 1986. Effect of active immunization against LHRH or LH in boars : reproductive consequences and performance traits. *J. Anim. Sci.*, **63**, 986-994.
- HOSMALIN A., CARELLI C., GAILLARD F., LEFRANCIER P., DROBECQ H., LECLERC C., AMAR O., AUDIBERT F., CHEDID L., 1987. Structural requirements for the induction of immunological castration by linear monomeric LHRH-Lys-MDP administered in saline. *Clin. Immun. Immunopath.* (in press).
- PATERSON R.L.S., 1968. 5 α -androst-16-ène-3-one, compound responsible for taint in boar fat. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 31-38.
- RESSING J.L., STROMINGER J.L., LELOIR L.F., 1956. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959-976.
- UZU G., BONNEAU M., 1980. Relations entre la production spermatique et la teneur en androstenone dans les graisses du jeune verrat. *Ann. Zootech.*, **29**, 23-30.