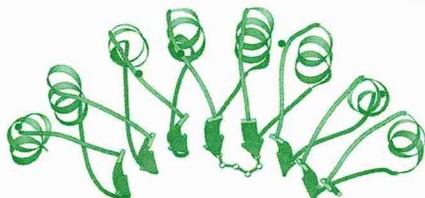
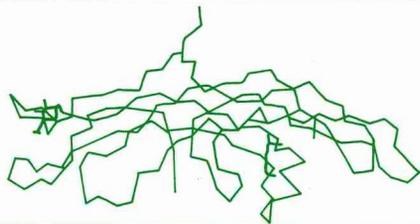


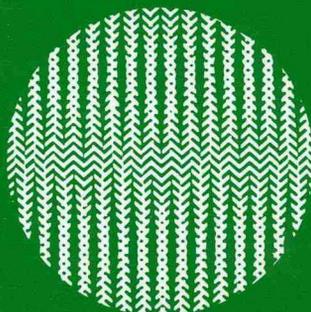
# LES GONADOTROPINES



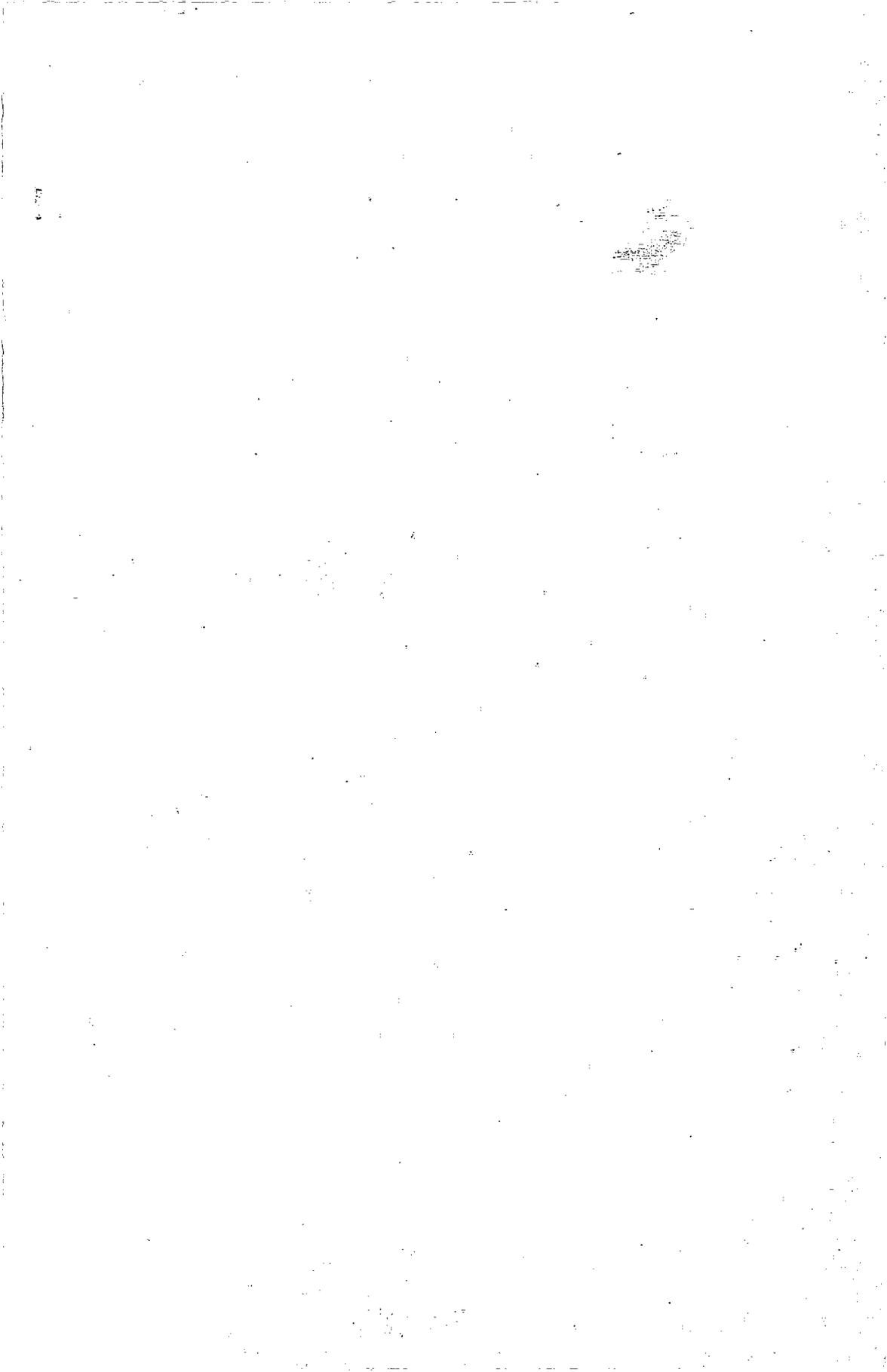
Editeurs

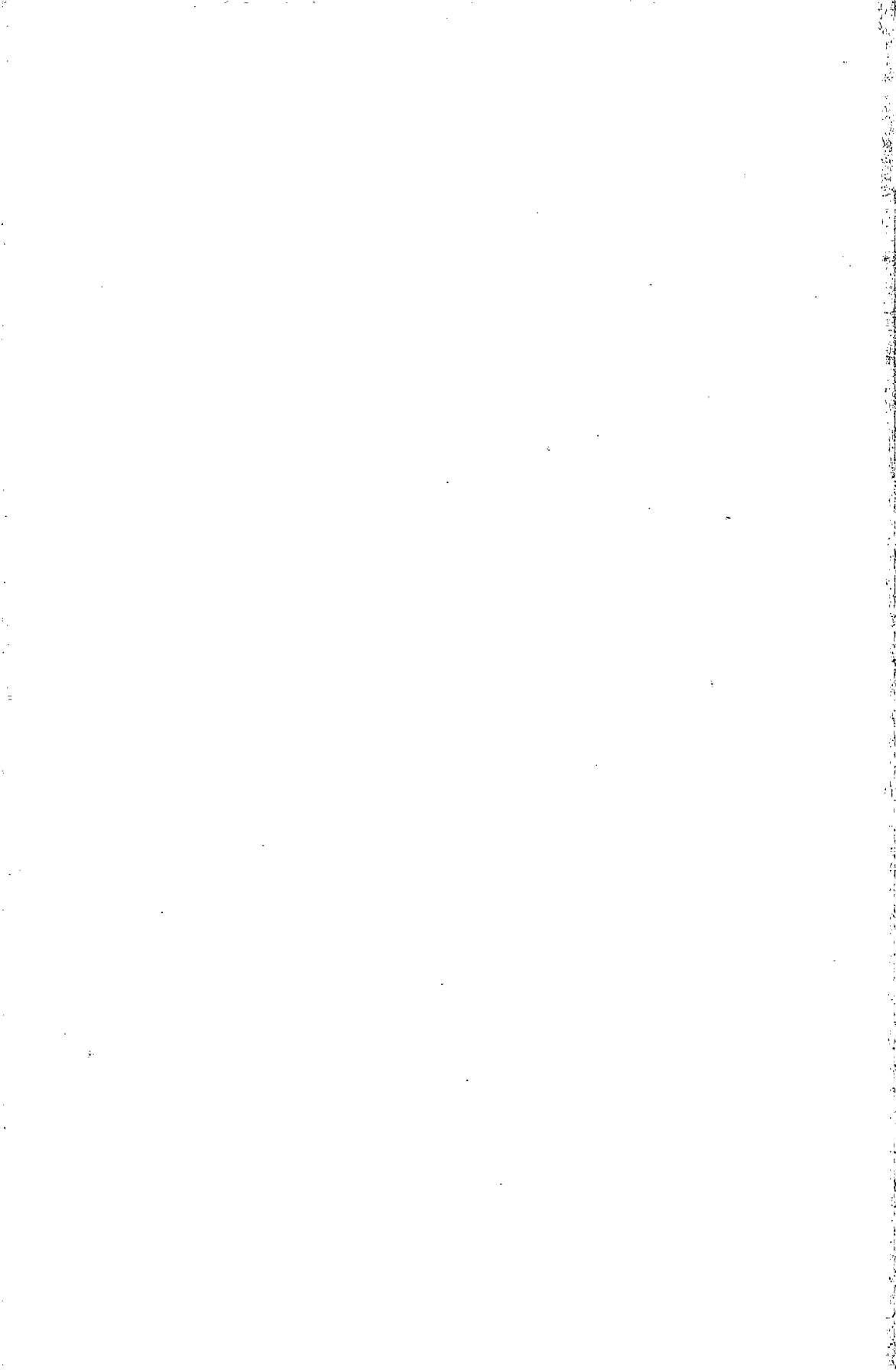
Y. COMBARNOUS  
P. VOLLAND-NAIL

SCIENCE UPDATE



**INRA**  
EDITIONS





# **LES GONADOTROPINES**

Editeurs

Y. COMBARNOUS  
P. VOLLAND-NAIL

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**  
147, rue de l'Université - 75338 Paris Cedex 07

*Editeurs*

Y. COMBARNOUS et P. VOLLAND-NAIL  
INRA - CNRS URA 1291  
Station de Physiologie de la Reproduction  
des Mammifères domestiques  
37380 Nouzilly, France

*En vente*

INRA Editions  
Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

© INRA, Paris, 1997  
ISBN : 2-7380-0762-7  
ISSN : 1159-554X

© Le code de la propriété intellectuelle du 1er juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique. Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 3, rue Hautefeuille, Paris 6ème.

## Préface

Y. COMBARNOUS, P. VOLLAND-NAIL

Les gonadotropines jouent un rôle primordial dans les régulations des fonctions gamétogénétiques et endocrines des gonades. Par leur intermédiaire, le système nerveux central, qui intègre de nombreux paramètres internes et externes, exerce son contrôle sur la fonction de reproduction. C'est pourquoi la recherche des mécanismes régissant la sécrétion et l'action des gonadotropines est d'un intérêt majeur depuis plus d'un demi-siècle.

Au cours de la dernière décennie, les développements considérables dans les techniques d'analyse des phénomènes biologiques a permis des avancées déterminantes de nos connaissances de ces hormones tant au plan moléculaire et cellulaire qu'au point de vue clinique. Le foisonnement de ces informations est à la fois enthousiasmant par sa richesse et décourageant par son volume.

L'ambition du présent ouvrage est d'offrir au lecteur francophone un panorama aussi large et actuel que possible des propriétés des gonadotropines, à tous les niveaux d'analyse, de manière à permettre une compréhension globale des phénomènes biologiques étudiés. Au travers de ce livre, c'est à une vision intégrée des mécanismes de régulation de la reproduction chez les Vertébrés que nous invitons le lecteur.

Pour la présentation de cet ouvrage, nous avons choisi de partir de l'échelle la plus petite pour considérer ensuite, l'un après l'autre, les niveaux d'organisation de plus en plus intégrés.

Nous présentons d'abord les chapitres consacrés aux **aspects moléculaires** des gonadotropines. Dans cette optique, il nous est apparu intéressant de considérer la phylogénie des gonadotropines (1) avant leurs structures (2, 3), afin de ne pas perdre de vue que ces dernières correspondent toutes à des évolutions fonctionnelles réussies. Cela conduisait bien sûr ensuite à considérer d'une part, la structure de leurs récepteurs (4), et d'autre part, les interactions avec ces récepteurs (5). Puis, nous abordons la description des propriétés immunologiques des gonadotropines, qui se sont avérées d'une grande pertinence, non seulement pour l'étude de leur structure (6), mais également pour celle de leur concentration (7).

Pour les **aspects cellulaires**, nous avons choisi de considérer d'abord l'ontogénèse de la fonction gonadotrope au niveau de l'hypothalamus (8) et de l'hypophyse (9), puis les mécanismes de contrôle du premier sur la seconde (10). Au niveau périphérique, les mécanismes cellulaires de régulation de l'expression des récepteurs sont présentés (11) avant de prendre en compte les effets génomiques faisant suite à l'interaction de ceux-ci avec leurs ligands respectifs (12). Le dernier chapitre de cette partie prend en compte que les gonadotropines non seulement stimulent, mais également désensibilisent leurs cellules-cibles (13).

C'est au niveau de l'organisme entier que les études précédentes prennent tout leur sens et tout leur intérêt. Les **aspects physiologiques** présentés dans la troisième partie occupent donc une place centrale dans cet ouvrage. Cette partie prend en compte d'abord les régulations centrales de la sécrétion des gonadotropines (14), puis les mécanismes de leurs contrôles respectivement sur les fonctions testiculaires (15, 16) et ovariennes (17, 18).

L'accumulation des connaissances concernant les propriétés moléculaires, cellulaires et physiologiques des gonadotropines a ouvert la voie à leur utilisation tant médicale que zootechnique. Pour débiter la présentation de ces **aspects cliniques**, il nous a paru important de considérer d'abord les techniques de production et de caractérisation des gonadotropines humaines (19), puis leurs utilisations cliniques dans l'espèce humaine (20). Les deux chapitres suivants sont consacrés à la sécrétion et à l'action de la gonadotropine chorionique humaine au cours des deux situations exceptionnelles que sont la grossesse (21) et les tumeurs (22). Enfin, le dernier chapitre fait le point sur l'utilisation des gonadotropines chez les bovins (23).

C'est grâce à la contribution enthousiaste et amicale de nombreux spécialistes des gonadotropines que nous avons pu réaliser cet ouvrage. Nous les remercions de leur collaboration et de leur confiance.

Nous espérons que cet ouvrage aidera les chercheurs à resituer leur propre contribution scientifique ou clinique dans l'ensemble des travaux consacrés aujourd'hui aux gonadotropines et surtout qu'il sera, pour les étudiants, professeurs, médecins, vétérinaires et biologistes, un document de référence précieux.



# Sommaire

## Première partie. Aspects moléculaires

1. Phylogénie des gonadotropines <i>B. Quérat</i>	11
2. Structure tridimensionnelle des gonadotropines <i>S. Brunie, M.M. Delage</i>	27
3. Structures glycaniques des gonadotropines et polymorphisme <i>C. Ronin</i>	39
4. Structure des récepteurs des hormones glycoprotéiques <i>J.J. Rémy, E. Pajot-Augy, R. Salesse</i>	55
5. Bases moléculaires de la spécificité des gonadotropines <i>Y. Combarnous, M. Chopineau, N. Martinat</i>	69
6. Immunochimie des gonadotropines <i>J.M. Bidart, M.C. Maurel</i>	79
7. Dosages immunologiques des gonadotropines <i>J.P. Gosling</i>	107

## Deuxième partie. Aspects cellulaires

8. Les neurones à GnRH : origine et localisation <i>M. Caldani, A. Caraty</i>	127
9. Ontogenèse de la fonction gonadotrope hypophysaire <i>C. Taragnat</i>	143
10. Biosynthèse et sécrétion des gonadotropines hypophysaires et placentaires, organisation des gènes et contrôle de leur expression <i>R. Counis</i>	157
11. Régulations moléculaires de l'expression des récepteurs des gonadotropines <i>R. Salesse, J.J. Rémy, E. Pajot-Augy</i>	177
12. Régulation génomique des gènes cibles des hormones gonadotropes <i>F. Guillou</i>	193
13. Désensibilisation par les gonadotropines de leurs cellules-cibles <i>F. Guillou, C. Troispoux, V. Laurent-Cadoret</i>	207

**Troisième partie. Aspects physiologiques**

14. Contrôle central de la sécrétion des gonadotropines par les neurones à GnRH 225  
*A. Caraty, M. Caldani, J.C. Thiery, B. Malpoux, P. Chemineau*
15. Gonadotropines et régulations paracrines testiculaires 241  
*H. Lejeune, F. Chuzel, R. Habert, J.M. Saez*
16. Contrôle gonadotrope des cellules somatiques et de la spermatogenèse des Vertébrés 255  
*M.T. Hochereau-de Reviers, M. Loir, M. de Reviers*
17. Gonadotropines et régulations paracrines ovariennes. Intégration des mécanismes de régulation d'un processus physiologique complexe, la folliculogenèse ovarienne 267  
*D. Monniaux, P. Monget*
18. Contrôle de la folliculogenèse terminale par les gonadotropines 285  
*M.A. Driancourt, Y. Cognié*

**Quatrième Partie. Aspects cliniques**

19. Production et purification des gonadotropines naturelles et recombinantes pour la clinique humaine 305  
*M. Dreano, A. Ythier*
20. Les gonadotropines en clinique humaine. L'induction de l'ovulation et sa surveillance 319  
*D. Royère, P. Barrière*
21. Gonadotropines et gestation chez la femme 341  
*P. Leymarie, M. Herrou*
22. Gonadotropines et tumeurs 357  
*J.M. Bidart, D. Bellet*
23. Utilisation des hormones gonadotropes hypophysaires chez les bovins 377  
*M. Nibart, P. Humblot*

- Liste des auteurs** 395

Première partie  
**Aspects moléculaires**



## Phylogénie des gonadotropines

B. QUERAT

### Introduction

Les premières expériences décrivant la capacité d'extraits hypophysaires à stimuler la croissance des follicules ovariens et l'ovulation furent décrites au début des années 20 (Evans et Long, 1922). S'animaient alors les premières discussions sur l'existence d'un ou de deux facteurs responsables des différentes activités observées. Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que Fevold et ses collègues (1931) réussirent à séparer deux fractions à partir d'hypophyses de brebis. L'une était capable de stimuler la croissance folliculaire et l'autre induisait la lutéinisation. Ces deux fractions hormonales furent donc désignées respectivement hormone folliculo-stimulante (FSH) et hormone lutéinisante (LH). Les premières purifications du facteur thyroïdote hypophysaire furent accomplies vers la fin des années 50 (Condliffe et Bates, 1956). Avant même d'en connaître la structure biochimique, observant la capacité des LH et FSH mammaliennes à stimuler la thyroïde d'un poisson, Fontaine (1969) émettait l'hypothèse que les gonadotropines et la thyrotropine (TSH) constituaient une famille d'hormones homologues. Peu après, Papkoff et Samy (1967) puis Pierce et ses collaborateurs (1971) mettaient en évidence la présence, respectivement dans la LH et dans la TSH, de deux sous-unités. Les relations entre les sous-unités des différentes hormones glycoprotéiques furent ensuite rapidement observées (l' $\alpha$  commune, chez une espèce donnée, et la  $\beta$  responsable de la spécificité hormonale), permettant à Pierce (1971) d'effectuer les premières expériences de formation d'hybrides et confortant l'hypothèse d'une parenté entre ces hormones. La preuve définitive de l'homologie des sous-unités  $\beta$  fut apportée quand les premières séquences des deux sous-unités des hormones glycoprotéiques mammaliennes

étaient obtenues. Dès lors, la question qui se posait était de savoir quand, et dans quel ordre, les duplications géniques conduisant aux trois lignées de sous-unités  $\beta$  avaient eu lieu. Les difficultés rencontrées pour isoler deux fractions gonadotropes distinctes chez les diverses classes de tétrapodes rendaient la question plus aiguë. Progressivement cependant, les trois types d'hormones LH, FSH et TSH ont pu être identifiées tant chez les oiseaux que chez les reptiles et les amphibiens (Licht *et al.*, 1977). Le problème fut donc reporté au niveau des "poissons". Chez ceux-ci en effet, en plus de la TSH, une seule gonadotropine glycoprotéique (GTH) semblait alors présente, laquelle était capable d'assurer le développement gonadique complet, cumulant ainsi les activités biologiques de type LH et FSH (Burzawa-Gérard, 1982). Puis, comme chez les tétrapodes, l'amélioration des techniques de purification protéique a permis l'identification d'une deuxième hormone gonadotrope (Suzuki *et al.*, 1988), du moins chez un certain nombre de poissons téléostéens. Au moment de cette découverte, aucune spécificité d'action ne permettant de les affilier spécifiquement aux LH et/ou aux FSH des tétrapodes, ces deux gonadotropines furent dénommées GTH1 et GTH2.

Ces dernières années, de nombreuses séquences de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de gonadotropines et de thyrotropines ont été obtenues, particulièrement dans le domaine des poissons téléostéens, offrant la possibilité d'établir les premiers arbres phylogénétiques décrivant les liens de parenté entre les différents types d'hormones glycoprotéiques des vertébrés.

## **1. Présence et distribution**

### **1.1. Sarcoptérygiens (tétrapodes, coelacanthes, dipneustes)**

Les deux gonadotropines hypophysaires LH et FSH, et la thyrotropine TSH ont été mises en évidence dans la quasi totalité des groupes taxonomiques de tétrapodes (pour revue, Licht *et al.*, 1977). On ne possède cependant pas d'informations fiables en ce qui concerne les sarcoptérygiens primitifs, coelacanthes et dipneustes. De plus, la LH n'a pas encore pu être caractérisée chez les reptiles squamates (serpents, lézards), pour lesquels un phénomène d'extinction génique (perte de la capacité à exprimer le gène de la LHB) ne peut pas être écarté.

Par ailleurs, en plus des gonadotropines hypophysaires, certains mammifères disposent d'une gonadotropine d'origine chorionique (CG). Chez les primates, la CG est apparue à la suite d'une duplication du gène codant pour la sous-unité LH $\beta$  (Talmadge *et al.*, 1984). La nouvelle copie de gène a subi un certain nombre de mutations/délétions ; les plus importantes conduisent, d'une part, à une modification de la phase de lecture dans la partie 3' de la région codante, résultant en une modification avec extension d'une trentaine d'acides aminés de la partie carboxy-terminale de la protéine, et d'autre part, à la capacité du gène à être exprimé dans les cellules du trophoblaste. Chez les équidés, le même gène code pour la LH $\beta$  et la CG $\beta$  (Sherman *et al.*, 1992). Il présente également un décalage de la phase de lecture dans la partie 3' de la région codante (par rapport aux gènes LH $\beta$  d'autres espèces proches), résultant cependant d'un mécanisme différent de celui des primates. La présence de gonadotropine chorionique a également été décrite chez d'autres mammifères, notamment la rate et la vache (références dans Ng, 1993), chez lesquels une seule copie de gène apparenté à la LH $\beta$  est cependant connue. Il s'agirait donc, chez ces espèces, comme chez les équidés, d'une LH synthétisée par le placenta et ne différant de la LH hypophysaire que par sa composition en chaînes glycosylées.

## 1.2. Actinoptérygiens (poissons osseux)

Les connaissances sont limitées aux téléostéens et, dans une moindre mesure, aux chondrostéens (pour revue : Quérat, 1994). La GTH2 a été caractérisée chez tous les téléostéens étudiés, des plus primitifs aux plus modernes, et chez les chondrostéens. La GTH1, par contre, n'avait pas été jusqu'à récemment caractérisée chez des téléostéens anciens comme l'anguille, la carpe ou le poisson chat, justifiant l'hypothèse qu'elle serait issue d'une duplication récente, au cours de l'évolution des téléostéens, du gène de la GTH2 $\beta$ . Elle a depuis été caractérisée chez le poisson rouge (Yoshiura *et al.*, 1997), poisson appartenant au même groupe que les carpes et poissons chats. Bien qu'une deuxième gonadotropine ait été purifiée chez les chondrostéens, sa nature (type GTH1 ou autre) n'a toujours pas été élucidée. Les données concernant les rôles spécifiques des GTH1 et GTH2 sont encore limitées et ne portent que sur les salmonidés. Chez ces espèces, le profil temporel d'expression de ces deux hormones tend à ressembler à celui des LH et FSH des tétrapodes, la GTH1 étant exprimée, comme la FSH, durant la première partie du cycle pour promouvoir la gamétogénèse, tandis

que la GTH2 serait responsable de l'ovulation ou la spermiation (Swanson, 1991). Cet apparent parallélisme dans les spécificités fonctionnelles entre les gonadotropines de ces téléostéens et celles des tétrapodes suggère une relation de parenté structurale équivalente. Les GTH1 et FSH d'une part, GTH2 et LH d'autre part, seraient donc les descendants, chez les actinoptérygiens et les sarcoptérygiens respectivement, de deux précurseurs présents avant la dissociation de ces deux groupes de vertébrés.

Un certain nombre de particularités des gonadotropines de poissons téléostéens méritent d'être soulignées (pour revue : Quérat, 1994).

- La *première* est que, contrairement aux LH et FSH des mammifères, la GTH1 et la GTH2 sont synthétisées par des types cellulaires différents. Il s'agit peut-être là d'un moyen différent (plus primitif ?) de celui des tétrapodes pour permettre à ces deux gènes  $\beta$  d'être régulés indépendamment.

- La *deuxième* est que, du fait probablement de leur tétraploïdie, ou du passage par la tétraploïdie chez leurs ancêtres récents, nombre de poissons disposent de deux sous-unités  $\alpha$  différentes, codées par des gènes propres, et rentrant dans la composition de l'une, de l'autre ou des deux gonadotropines.

- La *troisième* concerne les caractéristiques biochimiques de la GTH1. Cette hormone présente une résistance inhabituelle à la dissociation, un traitement réducteur étant nécessaire, laissant supposer qu'une liaison covalente pourrait unir les deux sous-unités.

### **1.3. Autres vertébrés**

Aucune séquence de sous-unité d'hormone glycoprotéique de chondrichthyens (éla-smobran-ches et holocéphales) ou d'agnathes (mixinoïdes et lamproies) n'est actuellement disponible. Il semble cependant bien établi que deux activités gonadotrope et thyroïdienne distinctes soient présentes dans les extraits hypophysaires d'éla-smobran-ches, une fraction gonadotrope ayant même été partiellement purifiée chez la roussette (Sumpter *et al.*, 1978). De même, bien qu'aucune hormone glycoprotéique n'ait jusqu'à présent pu être purifiée chez les lamproies, des expériences d'hypophysectomie partielle et l'analyse histologique de

l'hypophyse font suggérer à Joss (1985) la présence d'une thyrotropine et d'une gonadotropine distinctes.

## 2. Arbres phylogénétiques des sous-unités $\beta$

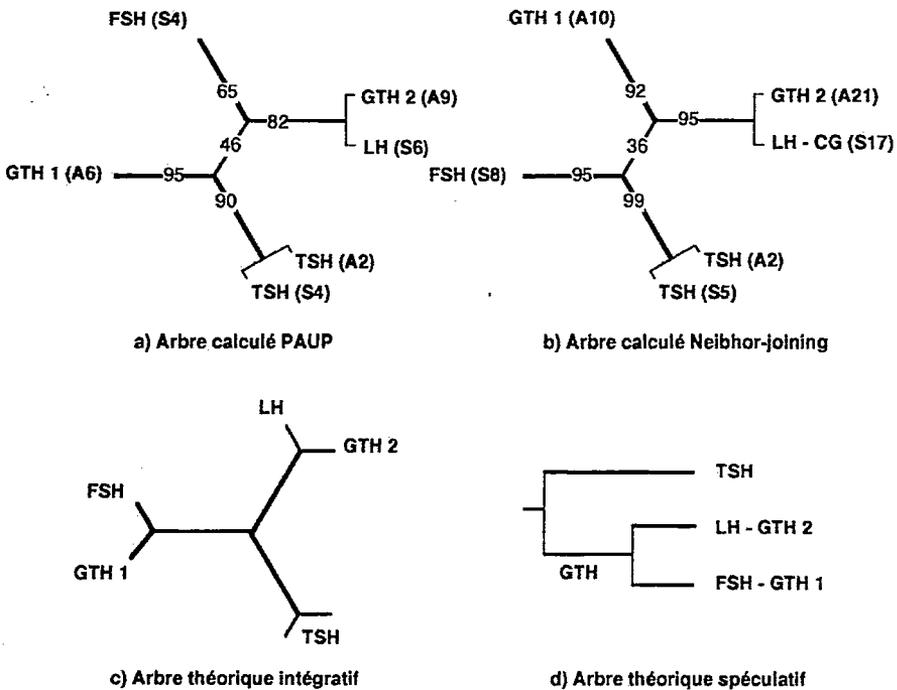
Comme nous venons de l'évoquer, deux voies évolutives sont envisageables pour expliquer la dualité des gonadotropines chez les actinoptérygiens et chez les sarcoptérygiens. La première, la plus parcimonieuse (celle qui nécessite le moins grand nombre de pas évolutifs) est de considérer qu'elles résultent d'une duplication ancienne, précédant la séparation entre les actinoptérygiens et les sarcoptérygiens : un précurseur aurait donc donné la FSH chez les sarcoptérygiens, et la GTH1 (plutôt que la GTH2, d'après les équivalences fonctionnelles) chez les actinoptérygiens (ces deux hormones formant un groupe monophylétique, c'est-à-dire, ayant un ancêtre commun exclusif), l'autre précurseur donnant l'autre groupe monophylétique, composé de la LH et de la GTH2. La deuxième hypothèse est que les deux gonadotropines sont apparues par deux duplications indépendantes, survenues après la séparation entre les deux groupes de vertébrés : dans cette hypothèse un premier groupe monophylétique comprendrait les deux hormones des sarcoptérygiens LH et FSH, l'autre groupe étant composé des GTH1 et GTH2 des actinoptérygiens.

Afin d'essayer d'identifier laquelle de ces deux voies évolutives a réellement été empruntée, et donc de mieux définir les liens de parenté entre les différents types de sous-unités  $\beta$ , leurs séquences peptidiques ont été soumises à une analyse phylogénétique suivant deux algorithmes différents, l'un basé sur une méthode cladistique de parcimonie (PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 2.4.1. Illinois Nat. Hist. Surv., Champaign, Illinois. Swofford DL, 1986.) et l'autre, basé sur des matrices de distances (Neighbor-joining : Saitou et Nei, 1987). Les deux méthodes ont été assorties de tests statistiques (Bootstrap) de robustesse des noeuds. Dans les deux cas, les TSH $\beta$  apparaissent comme un groupe monophylétique fortement soutenu par la valeur de Bootstrap, indiquant que cette lignée s'est individualisée avant la séparation entre actinoptérygiens et sarcoptérygiens. De même, les LHB de tétrapodes forment un groupe monophylétique avec les GTH2 $\beta$  de téléostéens et chondrostéens avec une probabilité satisfaisante pour les deux méthodes. Par contre les GTH1 $\beta$  et FSH $\beta$  forment deux groupes monophylétiques distincts. La figure 1 (a et b) représente les arbres simplifiés décrivant les relations de parenté de ces quatre groupes tels

qu'ils sont définis par les deux méthodes. Les deux algorithmes conduisent à des topologies qui diffèrent par les positions respectives des GTH1 $\beta$  et des FSH $\beta$ . On peut donc en conclure qu'au moins une des deux topologies est fautive. En fait, toutes deux sont incohérentes. En effet, si la lignée TSH $\beta$  d'une part, et la lignée composée des LH $\beta$  et GTH2 $\beta$  d'autre part, se sont individualisées avant la séparation entre actinoptérygiens et sarcoptérygiens, les FSH $\beta$  et GTH1 $\beta$  devraient aussi, suivant les deux topologies, être apparues avant cette séparation : on devrait donc trouver une GTH1 chez les sarcoptérygiens et, de même, une FSH chez les actinoptérygiens. Le problème porte donc soit sur l'embranchement des FSH $\beta$ , soit sur celui des GTH1 $\beta$ . Dans les deux méthodes, le noeud séparant le groupe comprenant les FSH $\beta$  du groupe comprenant les GTH1 $\beta$  n'est soutenu que par une valeur de Bootstrap très faible, inférieure à 50%, indiquant que ces regroupements ne sont pas fiables. D'ailleurs, si la séquence de la GTH1 $\beta$  de poisson rouge est omise de l'analyse phylogénétique, les mêmes algorithmes conduisent à des topologies strictement inverses (Quérat, 1995). De telles distorsions des arbres ne sont pas rares. Elles peuvent résulter d'un mauvais échantillonnage des séquences (Lecointre *et al.*, 1993) et/ou de trop grandes différences de vitesse d'évolution entre les différentes lignées à étudier (Swofford et Olsen, 1990). Or, les GTH1 $\beta$  cumulent les deux handicaps : d'une part les séquences des GTH1 $\beta$  de téléostéens anciens comme l'anguille ou, tout au moins, comme la carpe ou le poisson chat (qui, je le rappelle, appartiennent au même groupe phylogénétique que le poisson rouge) et de chondrostéens font défaut ; d'autre part, les séquences de GTH1 $\beta$  connues évoluent trois fois plus vite que celles des GTH2 $\beta$  (les distances entre les GTH1 $\beta$  de différentes espèces sont trois fois plus importantes que celles entre les GTH2 $\beta$  des mêmes espèces). Par ailleurs, selon les deux voies évolutives envisagées plus haut, les GTH1 $\beta$  devraient se regrouper soit avec les FSH $\beta$  soit avec les GTH2 $\beta$ . Dans la première hypothèse, seul l'embranchement des GTH1 $\beta$  serait mal positionné. Par contre, dans la deuxième hypothèse, deux des embranchements calculés selon les deux algorithmes seraient faux : celui des GTH1 $\beta$ , et aussi celui des GTH2 $\beta$  ou celui des LH $\beta$ , alors que le regroupement LH - GTH2 est soutenu par une valeur de Bootstrap élevée dans les deux méthodes. L'hypothèse la plus probable semble donc la première, celle d'un regroupement FSH - GTH1. Un tel schéma évolutif est en accord avec les données fonctionnelles, qui attribuent aux GTH1 un rôle proche de celui des FSH, et aux GTH2, celui des LH.

Il semble donc bien qu'au moment de la séparation entre actinoptérygiens et sarcoptérygiens, trois lignées de sous-unités  $\beta$  aient été présentes (fig. 1c) : une lignée TSH $\beta$ ,

une lignée FSH $\beta$ /GTH1 $\beta$  et une lignée LH $\beta$ /GTH2 $\beta$ . Les données actuelles ne permettent cependant pas de déterminer laquelle de ces trois lignées s'est individualisée la première. Le schéma le plus logique (fig. 1d), mais cela reste, bien sûr, une hypothèse, est celui d'une première duplication d'un gène  $\beta$  ancestral donnant une lignée TSH $\beta$  et une lignée GTH $\beta$ , permettant la séparation des contrôles gonadotrope et thyroïdienne ; un affinement du contrôle gonadotrope aurait été assuré par la duplication du gène GTH $\beta$  conduisant aux deux lignées gonadotropes actuelles. Dans ce sens, on peut voir dans l'avènement de la CG des primates, un surcroît d'affinement avec la duplication du gène de la LH $\beta$ .



**Figure 1** : Arbres des relations phylogénétiques des différents types de sous-unités  $\beta$ .

a) Arbre calculé selon la méthode de parcimonie (PAUP) à partir des séquences protéiques prises entre les cystéines 0 et 12 de sous-unités  $\beta$  représentatives des différents types d'hormones. b) Arbre calculé selon la méthode basée sur les matrices de distances (Neighbor-joining) à partir des séquences protéiques prises entre les cystéines 1 et 12 de toutes les sous-unités  $\beta$  disponibles. Le nombre de séquences provenant d'actinoptérygiens (A) ou de sarcoptérygiens (S) utilisées pour chaque type d'hormone est indiqué entre parenthèses. Les chiffres sur les branches représentent les valeurs de Bootstrap des noeuds (en %). c) Arbre théorique intégrant les différentes données, définissant les trois lignées (voir texte). d) Arbre spéculatif décrivant l'avènement des trois lignées (voir texte).