

50376  
1976  
48  
N° d'ordre

50376  
1976  
48

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE

PAR

**Dominique CROIX**

**Mise au point de dosages radioimmunologiques  
des gonadotrophines FSH et LH de cobaye.  
Applications à l'étude de la période post-natale,  
du cycle œstral et de la castration**



SOUTENUE LE 20 AVRIL 1976, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :	Monsieur J. MONTREUIL	Président
	Monsieur P. FRANCHIMONT	Rapporteur
	Monsieur J. BARRY	Examineur
	Monsieur J.P. ROUSSEAU	Examineur
	Monsieur A. VERBERT	Examineur

Ce travail a été réalisé, sous la direction de Monsieur le Professeur Julien BARRY, dans les Laboratoires suivants :

- Laboratoire d'Histologie (Professeur Julien BARRY) de la Faculté de Médecine de Lille.
  
- Laboratoire de Radio-Immunologie (Professeur Paul FRANCHIMONT) de l'Institut de Médecine de Liège.

Nous remercions vivement le Professeur  
Paul FRANCHIMONT, et le Docteur Jean-Claude HENDRICK,  
de son équipe, de nous avoir initiée aux méthodes  
radio-immunologiques.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,  
CORSIN, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE  
BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG,  
MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ,  
ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique

M.	GONTIER Gérard	Mécanique
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M <sup>le</sup> DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DYMENT Arhtur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M <sup>me</sup> EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>le</sup> KOSMAN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>le</sup> LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>le</sup> LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>me</sup> N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale

M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STEEN Jean-Pierre	Informatique
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE Michel	Mécanique
M. WALLART Francis	Chimie
M. WERNIER Georges	Informatique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

## TABLE DES MATIERES

---

<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u> : MATERIEL ET METHODES .....	9
I - PREPARATION DES FRACTIONS HYPOPHYSAIRES "FSH" ET "LH" DE COBAYE .....	10
A - Méthode par chromatographies sur échangeurs d'ions .	11
1) Poudre acétonique .....	11
2) Extraction des glycoprotéines .....	11
3) Séparation de FSH et de LH .....	13
4) Purification de la fraction FSH .....	14
B - Méthode d'extraction et de fractionnement au sulfate d'ammonium .....	15
1) Purification de la FSH .....	17
2) Purification de la LH .....	17
II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES .....	19
A - Préparations hormonales utilisées .....	19
1) Pour le marquage .....	19
2) Pour les courbes de références et les contrôles de spécificité .....	20
3) Extraits antéhypophysaires de cobaye .....	21
B - Antisérums utilisés .....	21
C - Marquage .....	22



D - Techniques de dosages .....	27
1) Immunoprécipitation ou technique du "double anticorps", à 4°C .....	27
2) Immunoprécipitation à température ambiante ..	28
3) Immunoabsorption .....	28
4) Dosage des gonadotrophines dans les sérums de cobayes .....	30
 III - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17 $\beta$ OESTRADIOL .....	 32
A - Dosage de la progestérone .....	32
1) Extraction de la progestérone contenue dans les échantillons de sérum .....	32
2) Dosage .....	32
B - Dosage de l'oestradiol .....	34
1) Extraction de l'oestradiol contenu dans les échantillons de sérum .....	34
2) Dosage .....	34
 IV - ANIMAUX .....	 35
A - Période post-natale .....	35
B - Cycle oestral .....	35
C - Castration .....	40
D - Injection de LRF .....	40
 <u>RESULTATS</u> .....	 41
 I - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES .....	 42
A - Etablissement des courbes de références .....	42
1) Expression des résultats .....	42
2) Antisérums .....	42
a) Systèmes homologues .....	42
b) Systèmes hétérologues .....	42

3) Reproductibilité .....	43
4) Sensibilité .....	44
<b>B - Obtention d'une réaction croisée entre les gonatrophines de rat et celles du cobaye .....</b>	<b>45</b>
1) Dosage de la FSH .....	45
a) Système homologue de rat .....	45
b) Systèmes hétérologues .....	45
- avec des antisérums anti FSH ovine .....	45
- avec un antisérum anti FSH humaine .....	48
2) Dosage de la LH .....	50
a) Système homologue de rat .....	50
b) Systèmes hétérologues avec des antisérums anti LH ovine .....	50
<b>C - Dosage des fractions purifiées .....</b>	<b>52</b>
1) Dosage de la FSH .....	52
2) Dosage de la LH .....	52
<b>D - Dosage des gonadotrophines dans les sérums de cobayes .....</b>	<b>55</b>
<b>E - Représentation graphique des modifications des taux sériques en fonction de l'état physiologique ou expérimental des animaux .....</b>	<b>55</b>
<b>II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17<math>\beta</math> OESTRADIOL .....</b>	<b>59</b>
A - Dosage de la progestérone .....	59
B - Dosage de l'oestradiol .....	60
<b>III - PERIODE POST-NATALE .....</b>	<b>61</b>
A - LH .....	61
B - FSH .....	61

IV - CYCLE OESTRAL .....	65
A - LH .....	65
B - FSH .....	65
C - Progestérone .....	66
D - Oestradiol .....	66
V - CASTRATION .....	68
A - LH .....	68
B - FSH .....	68
VI - INJECTION DE LRF .....	75
<u>DISCUSSION</u> .....	77
<u>CONCLUSION</u> .....	85
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	89

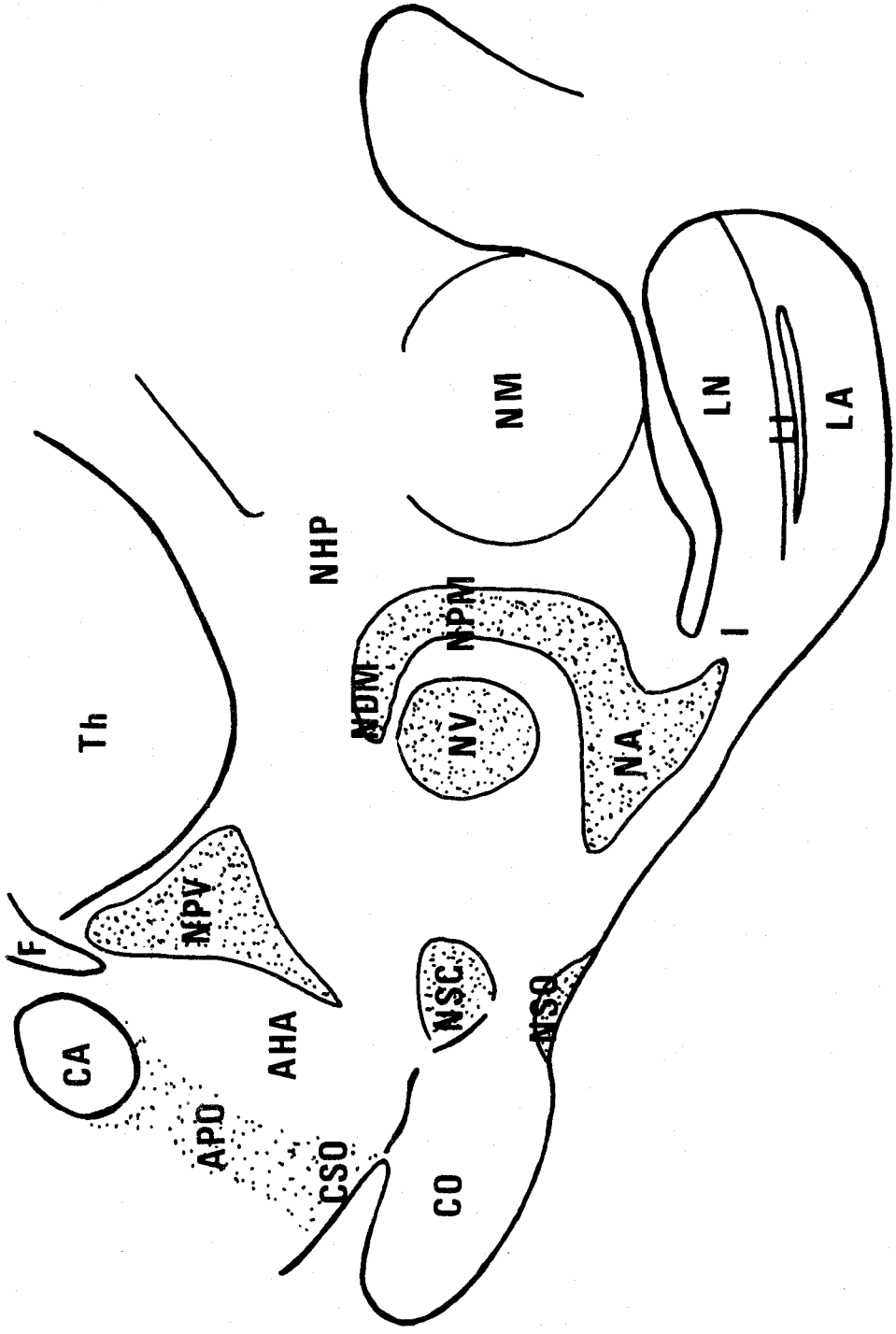
I N T R O D U C T I O N

---oo0oo---

Les hormones gonadotropes sont élaborées au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse par des cellules basophiles pour ce qui concerne la LH ("luteinizing hormone") et la FSH ("follicle stimulating hormone").

Ces hormones conditionnent les activités gamétogénétiques et endocrines des gonades. Leur sécrétion se trouve sous le contrôle de structures hypothalamiques.

En effet, des travaux de HALASZ et coll. 1962-1965 (1, 2, 3) et KNIGGE 1962 (4) portant sur des greffes d'antéhypophyses dans la partie médiobasale de l'hypothalamus ont conduit à déterminer une "aire hypophysiotrope" maintenant les caractéristiques cytologiques normales des cellules du greffon permettant la synthèse et la cession de LH et de FSH. Cette aire hypophysiotrope est formée par les cellules nerveuses, essentiellement les petites cellules du noyau arqué (Planche I p. 3), d'où sont issues les fibres du tractus tubéro-infundibulaire mis en évidence par SZENTAGOTHAI 1964 (5) par la technique de GOLGI. Ces fibres se terminent au niveau des capillaires du plexus porte primaire dans lesquels elles effectuent la cession des hormones pré-hypophysiotropes hypothalamiques LRF ("LH releasing hormone") et FRF ("FSH releasing hormone") qui commandent les sécrétions des cellules à LH et à FSH de l'antéhypophyse.



HALASZ et GORSKI 1967 (6), par interruption des connections neurales de l'aire hypophysiotrope avec le reste du cerveau, chez le rat, ont obtenu des modifications de la fonction gonadotrope de la femelle mais non du mâle, ce qui tendait à confirmer les hypothèses émises par BARRACLOUGH et GORSKI 1961 (7) et FLERKO 1962 (8), à savoir que l'aire hypophysiotrope était responsable de la sécrétion tonique des gonadotrophines ; leur sécrétion cyclique, chez les Rongeurs, nécessitant l'intégrité des afférences neurales de l'aire hypophysiotrope, serait placée sous le contrôle d'autres structures hypothalamiques, notamment de l'hypothalamus antérieur.

Les stéroïdes gonadiques jouent un rôle important dans la régulation de la sécrétion des hormones gonadotropes. Des neurones de l'hypothalamus antérieur fixant les oestrogènes tritiés ont été mis en évidence (KATO et VILLEE 1967 (9), STUMPF 1968-1971 (10, 11), WAREMBOURG 1970 (12), PFAFF et KEINER 1973 (13)) ; en outre des récepteurs d'oestradiol ont pu être isolés chez le rat par centrifugation en gradient de densité de sucrose à partir de l'aire préoptique antérieure, de l'éminence médiane et de l'antéhypophyse (KATO 1973 (14)).

De nombreux travaux tels ceux de FLERKO 1957 (15, 16), FLERKO et BARDOS 1960 (17), montrant le rôle de l'aire hypothalamique antérieure dans la diminution de la sécrétion de FSH après traitement aux oestrogènes chez les rats, ceux de HALASZ et GORSKI 1967 (6) montrant le rôle de cette aire dans l'augmentation de la sécrétion de FSH après castration, ainsi que les résultats après des lésions stéréotaxiques de l'hypothalamus antérieur pratiquées chez le cobaye femelle (POULAIN 1968 (18)) étaient en accord avec l'hypothèse de FLERKO et SZENTAGOTHAÏ 1957 (19) : l'aire hypothalamique antérieure, tout au moins chez les Rongeurs, contiendrait des récepteurs sensibles aux oestrogènes, responsables d'une rétroaction négative sur la sécrétion préhypophysaire de FSH. Ces récepteurs seraient en fait localisés en position immédiatement rostrale par rapport au noyau paraventriculaire (PASTEELS et ECTORS 1969 (20)).

Comme l'ont suggéré BARRACLOUGH et GORSKI en 1961 (7), alors que la région tubérienne serait responsable d'une sécrétion tonique de base de la LH et pourrait être soumise à une rétroaction négative des oestrogènes, la région suprachiasmatique serait un centre de cession cyclique de cette hormone chez le rat ; elle contiendrait des récepteurs, probablement localisés plus antérieurement et ventralement que ceux agissant sur les sécrétions de FSH (PASTEELS et ECTORS 1969 (20)), et sur lesquels s'exercerait une rétroaction positive des oestrogènes. Ceci expliquerait la nécessité d'une augmentation des taux d'oestrogènes circulants pour que puisse se produire la décharge préovulatoire de LH.

Les oestrogènes ont en fait une action biphasique sur la sécrétion de LH et sont en outre capables d'agir directement au niveau de la préhypophyse.

En effet, si l'injection de très faibles doses d'oestradiol affecte essentiellement la sécrétion de FSH, l'injection de doses plus élevées ou un traitement prolongé produit, dans un premier temps, une diminution des sécrétions des deux gonadotrophines et de la sensibilité de la préhypophyse pour le LRF (NEGRO-VILAR et coll. 1973 (21), BLAKE et coll. 1974 (22)) et, dans un second temps, un accroissement de cette sensibilité (DEBELJUK et coll. 1972 (23), LIBERTUN et coll. 1974 (24)) ainsi qu'une augmentation très nette des taux de LH sérique qui présentent, chez la femme, un phénomène de "rebond" lorsque le traitement est interrompu (FRANCHIMONT 1971 (113)) ; ceux de FSH n'augmentent que plus modérément pour revenir aux concentrations initiales.

Au cours du cycle oestral, cette sensibilisation par les oestrogènes est d'autant plus marquée que l'injection a été effectuée à un moment proche du pic préovulatoire normal de LH qui peut atteindre alors des valeurs très élevées.

Dans ce cas, l'hypothèse d'une rétroaction positive, plutôt que celle de la levée d'une inhibition produite par un rétrocontrôle négatif, peut être retenue par le fait que, chez le rat (LEGAN et



KARSCH 1973 (25)), le mouton (GODING et coll. 1969 (26)) et le singe KARSCH et coll. 1973 (27)), la décharge de LH peut être amorcée avant qu'il n'y ait eu une diminution des taux d'oestrogènes.

L'injection de fortes doses d'oestradiol provoque une diminution importante des taux des deux gonadotrophines avec un effet plus rapide pour la LH qui pourrait être dû à sa durée de vie plus courte (demi-vie de 21 minutes selon YEN et coll. 1968 (39)).

Par ailleurs, l'injection intrapéritonéale de benzoate d'oestradiol provoque une augmentation des taux d'AMP cyclique dans l'hypothalamus ; cette augmentation ne se produit pas lorsque les animaux ont été prétraités par des agents bloquants  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques ; les oestrogènes agiraient donc au niveau de l'hypothalamus par l'intermédiaire des neurones produisant des catécholamines dont la décharge stimulerait la formation d'AMP cyclique (GUNAGA et MENON 1973 (28), WEISSMAN et SKOLNICK 1975 (29)). L'injection d'AMP cyclique dans le 3ème ventricule entraîne une augmentation des taux de LH plasmatique lorsque les doses sont très élevées. L'AMP cyclique serait donc un facteur important de régulation des sécrétions gonadotropes.

Les neurones hypothalamiques dont nous avons parlé précédemment semblent être répartis de façon différente chez les Primates pour qui l'hypothalamus médiobasal, au niveau duquel sont localisés la plupart des sites oestrogéno-sensibles (FERIN et coll. 1974 (30)) est capable d'assurer, même isolé, la cession cyclique des gonadotrophines (KNOBIL 1974 (31)).

L'isolement du LRF (SCHALLY et coll. 1971 (32), l'établissement de sa structure et sa synthèse (MATSUO et coll. 1971 (33, 34), SCHALLY et coll. 1971 (35), SIEVERTSSON et coll. 1971 (36), MONAHAN et coll. 1971 (37)) ont permis la préparation d'antisérums spécifiques (KERDELHUE et JUTISZ 1971 (38), ARIMURA et coll. 1973 (40), DUBOIS).

Chez le cobaye après castration et injection intraventriculaire cérébrale de colchicine, BARRY et coll. 1973 (41) ont mis en évidence,

pour la première fois, des pérycaryons de neurones réagissant spécifiquement, en immunofluorescence, avec des antisérums anti LRF de synthèse. Ces pérycaryons ont également été observés chez le cobaye normal, mais en nombre moins important (BARRY et coll. 1974 (42)). Ils sont localisés essentiellement dans les noyaux du septum, l'aire préoptique, l'aire hypothalamique antérieure et la région suprachiasmatique ; leurs axones se terminent au niveau des capillaires du plexus porte primaire de l'hypophyse (LEONARDELLI et coll. 1973 (43)) ; ils forment une "voie préoptico-infundibulaire à LRF" (BARRY et DUBOIS 1973 (44)). Les observations effectuées lors de différents états physiologiques : période périnatale (BARRY et DUBOIS 1974 (45)), gestation (BARRY et DUBOIS 1973 (46)), cycle oestral (BARRY et DUBOIS 1974 (47)), et expérimentaux (BARRY et coll. 1974 (42), LEONARDELLI et coll. 1974 (48)) permettent de penser que ces neurones élaborent effectivement le LRF. En outre, la cession de LRF par ceux-ci serait stimulée par certains neurones monoaminergiques de l'aire hypophysiotrope qui agiraient directement au niveau des extrémités nerveuses périportales (KAMBERI et coll. 1969 (49), LEONARDELLI 1971 (50)).

Chez le singe, les pérycaryons spécifiquement immunoréactifs avec les anticorps anti LRF de synthèse sont localisés dans la région hypothalamique médiobasale : noyau infundibulaire et région prémammillaire (BARRY et coll. 1975 (51)).

Le LRF est un décapeptide de séquence :

(pyro) Glu - His - Trp - Ser - Tyr - Gly - Leu - Arg - Pro - Gly - NH<sub>2</sub>.  
L'existence de deux molécules différentes agissant l'une sur la cession de FSH (FRF), l'autre sur celle de LH (LRF) est actuellement discutée, le décapeptide LRF ayant une action sur la cession de LH, mais aussi, bien que moindre, sur celle de FSH (SCHALLY et coll. 1971 (52, 32)).

Les mécanismes de contrôle qui régissent les sécrétions des hormones gonadotropes sont donc très complexes et nous n'en connaissons pas, à l'heure actuelle, tous les éléments.

Les neurones élaborant le LRF ont été mis en évidence pour la première fois chez le cobaye. Les variations de charge au niveau du

tractus préoptico-infundibulaire que forment leurs axones ont été observées, par des techniques d'immunofluorescence, lors de différents états biologiques.

Cet animal présente en outre la particularité de posséder, dans l'hypothalamus latéral, des cellules neuro-sécrétrices n'élaborant pas le LRF, mais dont les variations de charge glandulaire sont fonction des taux d'hormones gonadiques (BARRY - 1962).

Il était alors intéressant de pouvoir doser les taux de LH et de FSH sériques chez ce même animal, d'étudier leurs variations dans diverses circonstances physiologiques et expérimentales et de confronter les résultats avec les observations qu'ont effectuées les auteurs que nous avons mentionnés précédemment, au niveau de l'hypothalamus.

Notre travail s'est donc déroulé selon les étapes suivantes :

- préparation de fractions partiellement purifiées de FSH et de LH hypophysaires de cobaye,
- mise au point des dosages radio-immunologiques des gonadotrophines de cobaye,
- étude des variations des taux sériques des gonadotrophines (et éventuellement des hormones gonadiques) au cours du cycle oestral, de la période post-natale et de la castration.

TRAVAUX PERSONNELS

---oo0oo---

## MATERIEL ET METHODES

---

### I - PREPARATION DES FRACTIONS HYPOPHYSAIRES "FSH" ET "LH" DE COBAYE

Les FSH et LH sont des glycoprotéines ; si leurs structures n'ont pas encore été entièrement établies, elles semblent cependant être relativement voisines d'une espèce à l'autre.

La FSH ovine possède un poids moléculaire approximatif de 30 000 ; elle est formée de deux sous-unités différentes de poids moléculaire 15 000 environ (CAHILL et HART 1969 (53)), associées par des interactions non covalentes ; cette hormone a un pHi voisin de 4,5 (PAPKOFF et coll. 1967 (54), CAHILL et coll. 1968 (55), SHERWOOD et coll. 1970 (56)) ; RYSZKA et coll. 1971 (57) ont pu mettre en évidence, par dichroïsme circulaire, une configuration en hélice  $\alpha$  qui pourrait intéresser jusqu'à 30 p. 100 des acides aminés (EKBLAD et coll. 1970 (58)).

La FSH humaine (BUTT et LYNCH 1972 (59)) est une protéine globulaire dont le rayon de la sphère équivalente est de 31 Å, sa partie glucidique, qui représente 9 à 30 p. 100 de la molécule, renferme des acides sialiques en position externe.

La LH humaine possède un poids moléculaire de 32 000 à 34 000 (RYAN et coll. 1970 (60), STOCKELL-HARTREE 1972 (61)) ; elle est également formée de deux sous-unités ( $\alpha = 96$  AA,  $\beta = 120$  AA). D'après des études effectuées sur la LH ovine, le rayon de STOKES est de 30 à 32 Å (RYAN et coll. 1970 (60), DE LA LLOSA et coll. 1967 (62), 1969 (63)), mais aucune hélicité n'a été trouvée (JIRGENSONS 1960 (64)). La partie glucidique, qui intervient pour 15 à 40 p. 100 dans la composition de la molécule (PAPKOFF 1966 (65)), ne comporte

pas d'acides sialiques. Le pHi de la LH est beaucoup plus basique que celui de la FSH ; en effet, il varie entre 7 et 9.

Pour préparer des fractions hypophysaires de cobaye enrichies en chacune de ces deux hormones, nous avons employé d'une part la méthode décrite pour l'extraction des gonadotrophines humaines par BUTT et coll. 1959 (66), 1961 (67), modifiée par STOCKELL-HARTREE 1966 (68), qui comprend essentiellement des chromatographies sur échangeurs d'ions (CM cellulose et DEAE cellulose), d'autre part celle décrite pour l'extraction des gonadotrophines de rat par REICHERT et MIDGLEY 1968 (69) qui s'effectue dans un premier temps par une série de fractionnements au sulfate d'ammonium.

A - Méthode par chromatographies sur échangeurs d'ions (Tableau I p. 12)

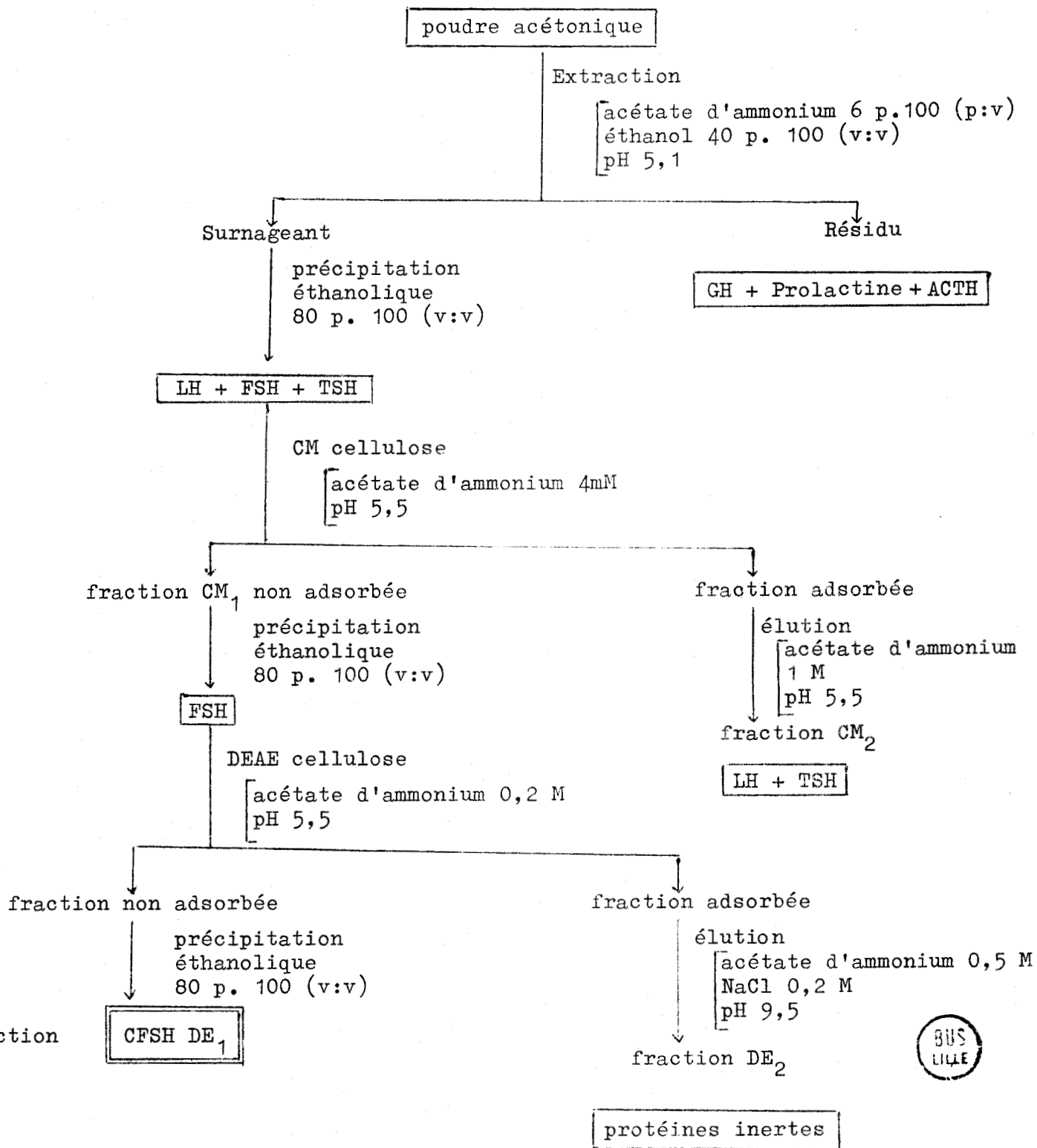
1) Poudre acétonique :

Nous avons prélevé deux lots de 300 et 500 antéhypophysés sur des cobayes âgés de 10 à 30 jours (âge pour lequel BROWN 1971 (70) a montré que les taux de FSH dans la glande pituitaire étaient très importants) ainsi qu'un lot de 150 préhypophysés sur des cobayes adultes mâles castrés. Ces antéhypophysés ont été conservés dans l'acétone anhydre et régulièrement renouvelé, à - 20°C, jusqu'à utilisation.

Toutes les étapes d'extraction sont effectuées ensuite à 4°C.

Après décongélation, les antéhypophysés sont homogénéisés au POTTER-ELVEHJEM, dans l'acétone ; après décantation, le surnageant est enlevé ; l'opération est répétée trois fois pour obtenir une bonne délipidation.

Tableau I : Schéma du fractionnement d'extrait antéhypophysaire par chromatographie sur CM cellulose et DEAE cellulose.



2) Extraction des glycoprotéines : (Procédé de STEELMAN et coll. 1958 (71) modifié par BUTT et coll. 1961 (67))

La poudre acétonique sèche est mise en suspension dans une solution :

acétate d'ammonium 6 p. 100 (p : v)

éthanol 40 p. 100 (v : v)

pH 5,1

Après une nuit d'agitation à 4°C, on effectue une centrifugation de 45 mn à 4 500 g (environ 7 000 rpm). Le surnageant est recueilli ; une nouvelle extraction est effectuée sur le culot.

La concentration en éthanol des surnageants réunis est amené à 80 p. 100 (v : v) par l'addition lente et sous agitation de deux volumes d'éthanol froid. L'agitation sera maintenue encore pendant 30 minutes. On laisse s'effectuer la complète précipitation des glycoprotéines pendant deux jours à 4°C. Après centrifugation, le culot est lavé par de l'éthanol à 96 p. 100 (v : v) et par de l'éther préalablement refroidis puis séché sous vide.

3) Séparation de FSH et de LH :

Le précipité de glycoprotéines est remis en solution pendant 12 heures à 4°C dans le minimum de tampon :

acétate d'ammonium 4 mM

pH 5,5

Après avoir centrifugé et relavé le culot, les surnageants rassemblés sont déposés sur une colonne de CM cellulose 11 (16 cm x 0,5 cm pour l'extrait correspondant à 300 glandes ; 14 cm x 1 cm pour celui de 500 glandes ou pour celui provenant des cobayes castrés), équilibrée dans le même tampon. La CM cellulose avait été préalablement ac-



tivée par les passages de solutions NaOH 0,5 N et HCl 0,5 N suivis chacun de rinçages à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Les débits des colonnes sont respectivement de 9 ml/h et 20 ml/h.

Dans ces conditions, la FSH n'est pas adsorbée ; elle est entièrement éluée par le passage d'une quantité de tampon égale à 2,5 fois le volume de la colonne. La présence des protéines est détectée par l'absorption en UV à 280 nm. Cette fraction, appelée  $CM_1$ , est amenée à une concentration 50 mM en acétate d'ammonium et ajustée au pH 5,5 par de l'acide acétique afin d'en précipiter ensuite les protéines par l'addition lente et sous agitation de 5 volumes d'éthanol froid. La suspension est laissée 2 jours à 4°C puis centrifugée. Le précipité est lavé par de l'éthanol à 96 p. 100 (v : v) et de l'éther préalablement refroidis.

La fraction adsorbée, contenant la LH et la TSH est éluée par deux volumes de tampon :

acétate d'ammonium 1 M

pH 5,5

Cette fraction est appelée  $CM_2$ . Après dialyse, les protéines en sont également précipitées par addition d'éthanol froid jusqu'à une concentration de 80 p. 100 (v : v) ; la suspension est ensuite centrifugée.

#### 4) Purification de la fraction FSH :

Une nouvelle chromatographie est ensuite effectuée sur la fraction  $CM_1$  par le passage sur une colonne de DEAE cellulose (11 cm x 0,5 cm ; débit 9 ml/heure - 10 cm x 1 cm ; débit 20 ml/heure), équilibrée dans le tampon :

acétate d'ammonium 0,2 m

pH 5,5

La DEAE cellulose avait été préalablement activée par les passages de solutions HCl 0,5 N, NaOH 0,5 N suivis chacun par des rinçages à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

La fraction CDE<sub>1</sub>FSH non adsorbée est éluée par le même tampon. Après dialyse, les protéines en sont extraites par précipitation à l'éthanol froid et centrifugation. Le précipité est lavé à l'éthanol et à l'éther et séché sous vide.

Les protéines restantes adsorbées sur la colonne sont éluées par du tampon :

acétate d'ammonium 0,5 M

NaCl 0,2 M

pH 9,5

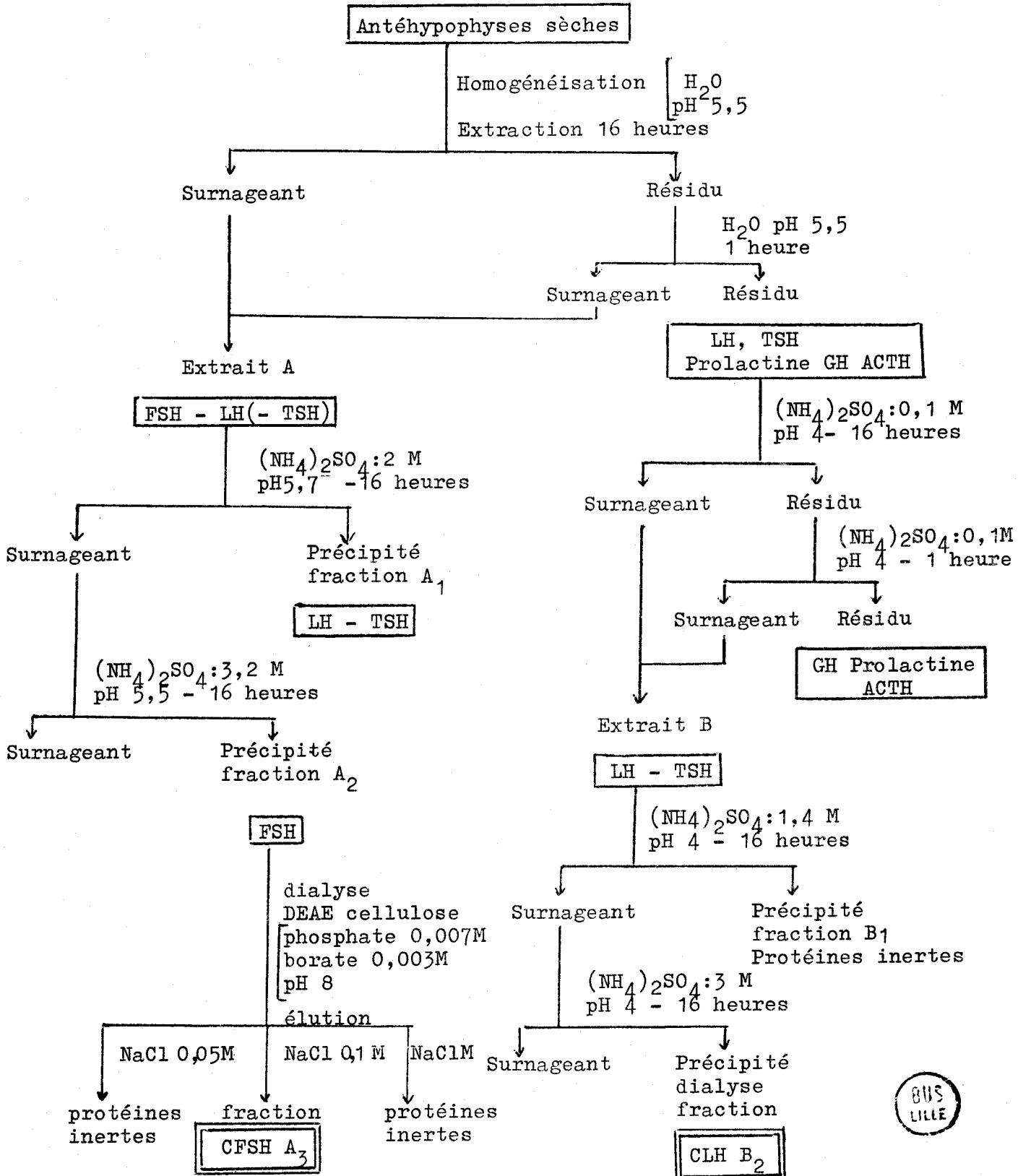
et constituent la fraction DE<sub>2</sub>.

**B - Méthode d'extraction et de fractionnement au sulfate d'ammonium**  
(Tableau II p. 16)

Toutes les étapes s'effectuent à 4°C.

Deux lots de 150 préhypophyses, prélevées sur des cobayes âgés de 10 à 30 jours et sur des cobayes adultes mâles castrés, conservées dans l'acétone anhydre à - 20°C jusqu'au moment de l'emploi, sont homogénéisées dans de l'eau distillée puis laissées pour une première extraction pendant 16 heures à pH 5,5. Après centrifugation et une nouvelle extraction d'une heure sur le culot, les surnageants, qui contiennent la FSH, sont rassemblés (Extrait A). Sur le culot sera effectuée l'extraction de la LH.

**Tableau II** : Schéma du fractionnement des hormones antéhypophysaires par précipitations au sulfate d'ammonium.



BUS LILLE

1) Purification de la FSH :

Les protéines inertes sont précipitées en amenant les surnageants à une concentration 2 M en sulfate d'ammonium à pH 5,7. Après 16 heures, elles sont écartées par centrifugation (fraction A<sub>1</sub>). La FSH est alors précipitée à partir du nouveau surnageant en amenant sa concentration en sulfate d'ammonium à 3,2 M à pH 5,5. Après 16 heures, elle est recueillie par centrifugation, remise en solution dans un minimum d'eau et dialysée contre de l'eau distillée (fraction A<sub>2</sub>). Cette fraction est alors déposée sur une colonne de DEAE cellulose (13 cm x 1 cm ; débit : 20 ml/heure), soit directement, soit après lyophilisation si le volume de la solution est trop important. La colonne est équilibrée dans le tampon :

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,007 M

Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,003 M

pH 8

Différentes fractions sont alors éluées successivement par des solutions de tampon additionné de NaCl à raison de 0,05 M ; 0,1 M et 1 M. La fraction qui correspond à la FSH est celle éluee par la concentration 0,1 M en NaCl (fraction CFSHA<sub>3</sub>).

2) Purification de la LH :

Le premier culot de centrifugation est remis en suspension dans une solution :

sulfate d'ammonium 0,1 M

pH 4

pendant 16 heures. Après centrifugation, on effectue une nouvelle extraction d'une heure et une nouvelle centrifugation. Les surnageants qui contiennent la LH (extrait B), sont rassemblés et amenés à une concentration 1,4 M en sulfate d'ammonium à pH 4 afin de précipiter (pendant 16 heures) les protéines inertes (fraction B<sub>1</sub>). Après centrifugation, la LH est à son tour précipitée en amenant le nouveau surna-

geant à 3 M en sulfate d'ammonium à pH 4 ; puis centrifugée 16 heures plus tard, resuspendue dans un minimum d'eau et dialysée puis lyophilisée ou reprécipitée à l'éthanol (fraction CLHB<sub>2</sub>).

## II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES

Le principe du dosage radio-immunologique est fondé sur la compétition d'une hormone marquée à l'iode et d'une hormone "froide" pour se fixer à un anticorps spécifique. Une quantité constante d'hormone marquée étant introduite, le pourcentage de la radioactivité fixée permet de connaître la quantité d'hormone froide contenue dans l'échantillon à doser.

On peut utiliser deux types de systèmes :

- soit un système homologue : c'est-à-dire lorsque l'antisérum a été fabriqué par injection à un animal (lapin ou cobaye) d'une hormone de la même espèce que celle qui sera introduite dans le dosage ;
- soit un système hétérologue : l'antisérum a été préparé à partir d'une hormone d'une espèce différente de celle qui sera introduite lors du dosage.

### A - Préparations hormonales utilisées

#### 1) Pour le marquage :

Ces préparations proviennent du National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health - Bethesda - Maryland - U.S.A.

Il s'agit de :

- la NIAMD rat FSH I<sub>1</sub> possédant une activité biologique de 100 unités NIH FSH S<sub>1</sub>/mg selon le test d'augmentation du poids des ovaires de rates immatures saturées d'hormone chorionique gonadotrope : test de STEELMAN et POHLEY 1953 (72), et une contamination en LH évaluée à un taux inférieur à 0,002 unités NIH LH S<sub>1</sub>/mg par la mesure de la déplétion ovarienne en acide ascorbique chez des rates en pseudogestation (OAAD) : test de PARLOW 1961 (73).
- la NIAMD rat LH I<sub>1</sub> dont l'activité biologique est de une unité NIH LH S<sub>1</sub>/mg, la contamination en FSH inférieure à 0,04 NIH FSH S<sub>1</sub>/mg et celle en TSH, de 0,4 USP U/mg (test de Mc KENZIE 1968 (74)).

2) Pour les courbes de références et les contrôles de spécificité :

- la NIAMD rat FSH RP<sub>1</sub> (activité biologique : 2,1 NIH FSH S<sub>1</sub>/mg ; contamination en LH : 0,02 NIH LH S<sub>1</sub>/mg)
- la FSH ovine NIH FSH S<sub>7</sub> (1,15 NIH FSH S<sub>1</sub>/mg ; 0,019 NIH LH S<sub>1</sub>/mg)
- la FSH porcine NIH FSH P<sub>1</sub> (0,76 NIH FSH S<sub>1</sub>/mg ; 0,0075 NIH LH S<sub>1</sub>/mg)
- la NIAMD rat LH RP<sub>1</sub> (activité biologique : 0,03 NIH LH S<sub>1</sub>/mg ; contamination en FSH : 0,54 NIH FSH S<sub>1</sub>/mg ; en TSH : 0,22 USP U/mg)
- la LH ovine M<sub>3</sub> obtenue par M. JUTISZ (2,55 NIH LH S<sub>1</sub>/mg)
- l' $\alpha$ HCG et la  $\beta$  FSH humaines qui nous ont été données par le Docteur R. CANFIELD et le Professeur L.E. REICHERT.

3) Extraits antéhypophysaires de cobaye :

Les différentes fractions d'extraction sont remises en solution dans de l'eau distillée ou dans le tampon de dosage. Leur concentration en hormone est évaluée soit par pesée préalable, soit par la mesure de l'absorption en UV à 280 nm. Les mesures concernant les hormones de rat utilisées comme références nous donnent la valeur :

Do 280 = 0,10 pour une concentration de 100  $\gamma$ /ml.

B - Antisérums utilisés

- L'antisérum anti FSH ovine préparé chez le lapin par HENDRICK et coll. 1971 (75) par immunisation contre de la FSH ovine SH 80 820 SHERING selon la méthode décrite par FRANCHIMONT 1964 (76).

100  $\mu$ g d'hormone sont dissouts dans 1 ml de NaCl 9 p.1000. Cette solution est émulsionnée ensuite dans 1 ml d'adjuvant de Freund et injectée à l'animal par une série de 20 piqûres intradermiques (de 0,1 ml chacune), dans la région dorsale. Le sérum est recueilli 4 semaines plus tard ; sa capacité à inhiber l'activité biologique de la FSH ovine est vérifiée ; avant utilisation, il est traité par du sérum de mouton de façon à écarter les anticorps anti-protéines sériques de mouton.

La spécificité de cet antisérum pour la FSH et ses caractéristiques ont été décrites par HENDRICK et coll. 1971 (75) et DUFY-BARBE et coll. 1972 (77).

Dans nos dosages, il est employé à des dilutions finales de :

1/4000 (immunoabsorption - double précipitation à température ambiante)

et 1/8000 (double précipitation à 4°C).



- Le NIAMD anti rat FSH sérum -2-, préparé chez le lapin et utilisé dans nos dosages à la dilution finale de 1/3500.
- Un antisérum anti FSH humaine, aux dilutions finales de 1/20 000 et 1/40 000.
- L'antisérum anti LH ovine préparé chez le lapin par immunisation contre de la NIH LH S<sub>15</sub> (DUFY-BARBE et coll. 1972 (77)). Il est employé dans nos dosages à la dilution finale de 1/32 000.
- Le NIAMD anti rat LH sérum -2-, préparé chez le lapin, utilisé à la dilution finale de 1/150 000.

### C - Marquage

2,5 µg de NIAMD rat FSH I<sub>1</sub> ou de NIAMD rat LH I<sub>1</sub> sont marqués au <sup>125</sup>INa (IRE, Mol ; CEA, Gif. sur. Yvette) selon la méthode à la chloramine T de GREENWOOD et coll. 1963 (78), dont les modalités sont les suivantes :

A 25 µl d'<sup>125</sup>INa d'activité 1 m Ci sont ajoutés :

- 2,5 µg de l'hormone à marquer dilués dans 25 µl d'eau,
- 25 µl de tampon phosphate 0,5 M. Tampon de SORENSEN de pH 7,5 et de composition :

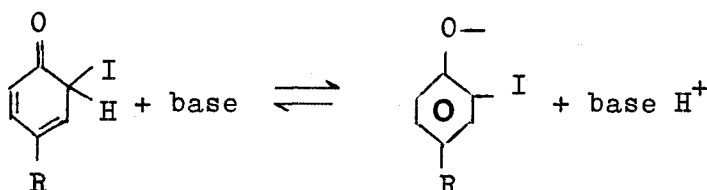
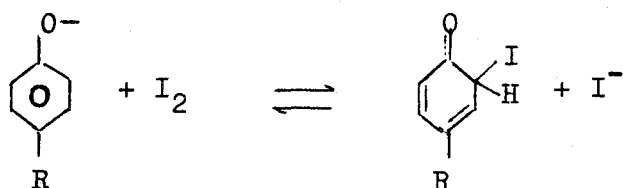
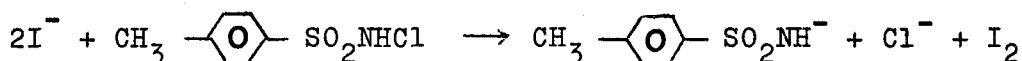
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	38,95 g
H <sub>2</sub> O	qsp 500 ml

- 25 µl d'une solution phosphate 0,05 M contenant 100 µg de chloramine T ou sel de sodium de N - monochloro-dérivé du p-toluène sulfamide :



L'addition de chloramine T à une solution alcaline de protéine et d'iodure va oxyder l'iode et permettre ainsi son incorporation sur les noyaux tyrosyles de la protéine. La

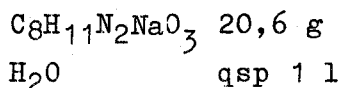
réaction s'effectue à un pH optimum de 7,5 ; à un pH supérieur à 8,5, des groupements autres que les tyrosines seraient substitués.



- On laisse s'effectuer la réaction pendant 30 secondes.
- 100  $\mu\text{l}$  de solution réductrice de métabisulfite de sodium (solution à 2,4 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{ml}$  de tampon phosphate 0,05 M) sont ensuite ajoutés afin d'arrêter la réaction.
- Le produit de réaction est ensuite dilué par addition de 200  $\mu\text{l}$  d'une solution d'iodure de potassium (solution à 10 mg KI/ml de tampon  $\text{PO}_4$  0,05 M).

Afin de séparer l'hormone marquée des sels radioactifs, la solution est déposée sur une colonne de 1,20 g de Séphadex G50 médium (14 cm x 1 cm) équilibrée dans le tampon barbital sodique 0,07 M de pH 8,6 obtenu par dilution (7 v.: 3 v. $\text{H}_2\text{O}$ ) du :

tampon barbital sodique 0,1 M :



12,9 ml sont retirés et remplacés par 12,9 ml HClN  
le pH est ajusté à 8,6.

La colonne a été préalablement saturée par le passage de 1 ml de tampon dans lequel ont été dissouts 20 mg d'albumine bovine, puis elle a été rincée par le passage de 20 ml de tampon afin d'éliminer l'albumine en excès.

Le tube où s'est effectuée la réaction de marquage est rincé par 400  $\mu$ l de la solution d'iodure de potassium. Ces 400  $\mu$ l sont également déposés sur la colonne.

Les fractions d'élution sont récoltées ml par ml dans des tubes contenant chacun 1 ml de tampon additionné d'albumine bovine à raison de 50 mg/ml.

L'hormone marquée est éluée essentiellement dans le 6ème tube ; le rendement moyen d'hormone récupérée est de 26,3 p. 100 (FRANCHIMONT 1966 (79)) ; elle a une activité spécifique de l'ordre de 100 à 200  $\mu$ Ci/ $\mu$ g ; les sels radioactifs libres sont élués plus tardivement avec un maximum aux 13ème ou 14ème fractions (Fig. n° 1 p. 25, Fig. n° 2 p. 26).

Le tube où s'est effectuée la réaction de marquage est rincé par 400  $\mu$ l de la solution d'iodure de potassium. Ces 400  $\mu$ l sont également déposés sur la colonne.

Les fractions d'élution sont récoltées ml par ml dans des tubes contenant chacun 1 ml de tampon additionné d'albumine bovine à raison de 50 mg/ml.

L'hormone marquée est éluée essentiellement dans le 6ème tube ; le rendement moyen d'hormone récupérée est de 26,3 p. 100 (FRANCHIMONT 1966 (79)) ; elle a une activité spécifique de l'ordre de 100 à 200  $\mu$ Ci/ $\mu$ g ; les sels radioactifs libres sont élués plus tardivement avec un maximum aux 13ème ou 14ème fractions (Fig. n° 1 p. 25, Fig. n° 2 p. 26).

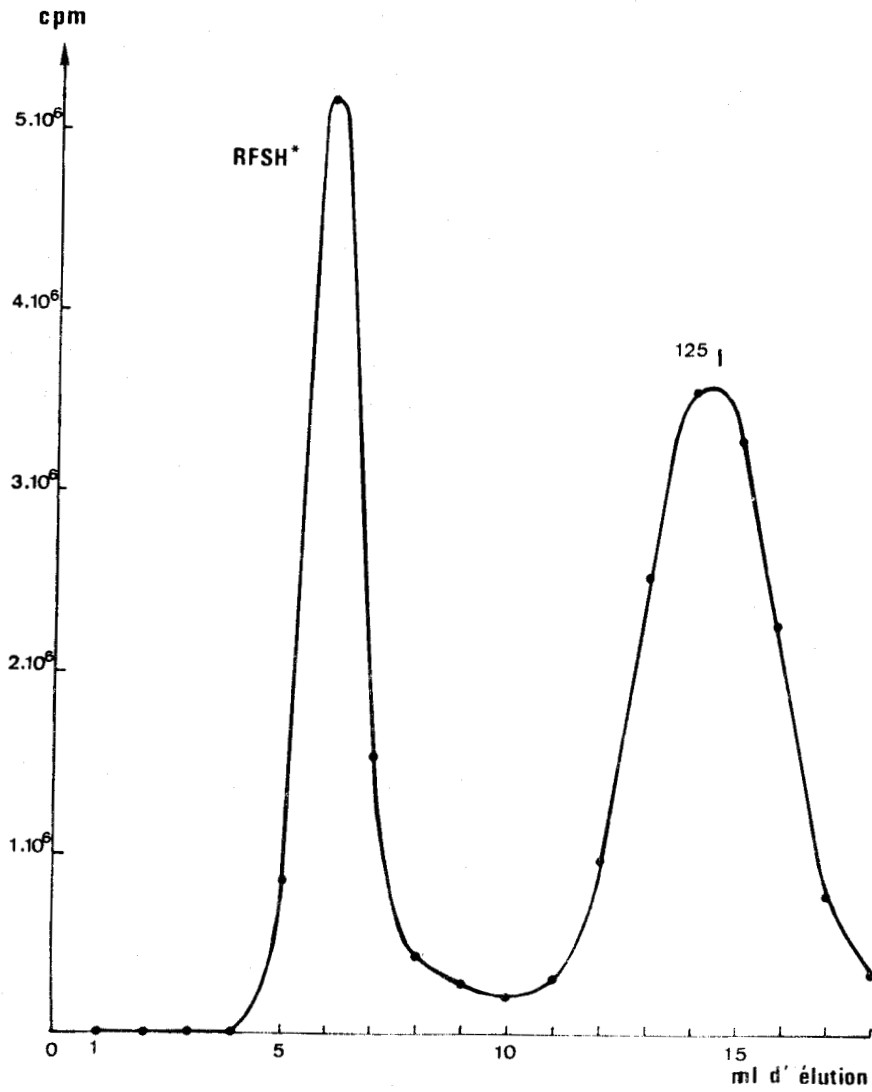


Figure n° 1 : Séparation sur Sephadex G 50 de la FSH\* et des sels minéraux radioactifs après marquage par l'<sup>125</sup>I.

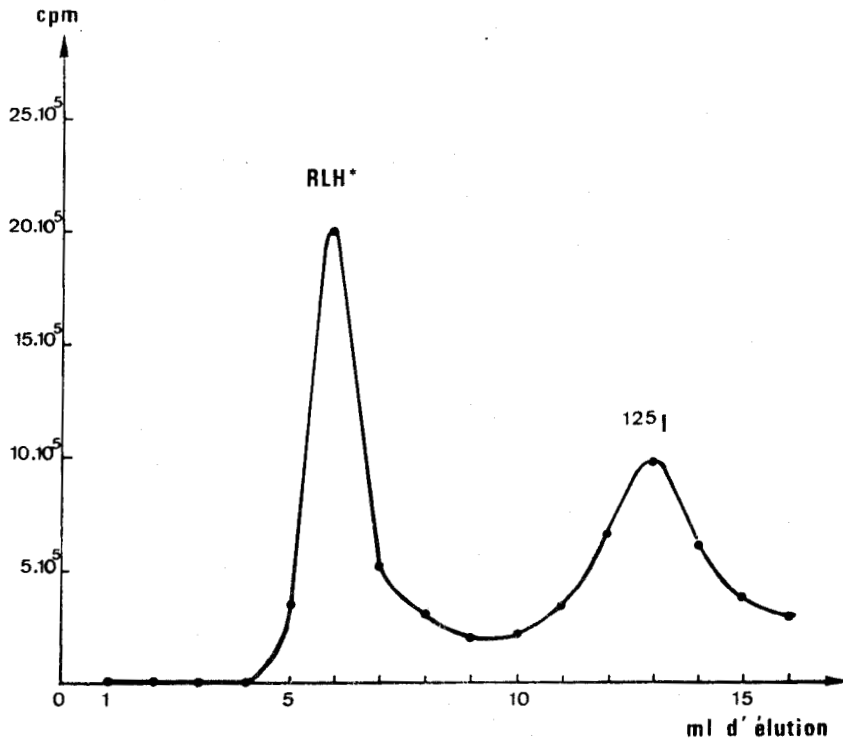


Figure n° 2 : Séparation sur Sephadex G 50 de la LH\* et des sels minéraux radioactifs après marquage par l'<sup>125</sup>I.



D - Techniques de dosages

1) Immunoprécipitation ou technique du "double anticorps" à 4°C :  
technique proposée par le NIAMD.

A 0,4 ml de tampon :

phosphate	0,01 M
NaCl	0,15 M
NaN <sub>3</sub>	0,1 p. 100
BSA	1 p. 100
pH	7,6

on ajoute :

- 0,1 ml d'une solution d'hormone marquée diluée de telle sorte qu'elle contienne 20 000 cpm/0,1 ml,
- 0,1 ml de l'échantillon à doser (hormones de références et extraits hypophysaires à différentes concentrations),
- 0,2 ml d'une solution contenant d'une part l'antisérum (dilué initialement à 1/2000 pour l'Ac anti FSH ovine  
1/875 pour l'Ac anti FSH de rat  
1/5000 et 1/10000 pour l'Ac anti FSH humaine  
1/8000 pour l'Ac anti LH ovine  
1/37500 pour l'Ac anti LH de rat

dans le tampon : phosphate 0,01 M,  
NaCl 0,15 M  
EDTA 0,05 M  
NaN<sub>3</sub> 0,1 p. 100) ;

d'autre part du sérum de lapin normal à raison de 0,5 p. 100.

Ce premier système est incubé 5 jours à 4°C afin que l'équilibre de la réaction puisse s'établir. Dans un second temps sont ajoutés 0,2 ml d'antigammaglobulines de lapin fabriquées chez le mouton (qui nous ont été fournies par les Laboratoires WELLCOME), à une dilution de 1/20ème. Après 2 jours à 4°C, on centrifuge 15 mn à 2500 g (environ 3000 rpm). Le surnageant est enlevé par aspiration ; le

précipité est lavé par 2 ml de tampon phosphate additionné de sérum de boeuf dilué au 1/5ème, décanté à nouveau puis sa radioactivité est comptée. Les essais sont effectués en triple pour les courbes étalon et en double pour les extraits hypophysaires.

2) Immunoprécipitation à température ambiante :

Les dilutions sont effectuées dans le tampon phosphate de Sorensen 0,05 M, pH 7,5, additionné d'albumine bovine à raison de 5 g/l et d'azide de sodium 0,5 g/l. A 0,1 ml d'antisérum dilué au préalable à 1/1000 pour l'anti FSH ovine et à 1/8000 pour l'anti LH ovine sont ajoutés 0,2 ml d'hormones de références ou d'extraits hypophysaires à différentes concentrations et 0,1 ml d'hormone marquée diluée (soit environ 20000 cpm). On laisse s'effectuer une incubation de 24 heures avant d'introduire 0,1 ml de sérum de lapin normal dilué au 1/100ème et 0,1 ml d'antigammaglobulines de lapin diluées au 1/10ème. Après une incubation de 16 heures, le précipité de chaque tube est lavé par 2,5 ml de tampon additionné de Tween 20 à raison de 5 ml/l. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 mn à 2500 g ; le surnageant est enlevé par aspiration ; la radioactivité du précipité est comptée. Les essais sont effectués en triple pour la courbe standard et en double pour les extraits hypophysaires.

3) Immunoabsorption :

Technique selon laquelle le double anticorps, c'est-à-dire les antigammaglobulines de lapin, est fixé à un substrat solide (DEN HOLLANDER et SCHUURS 1974 (80)).

Les immunoabsorbants utilisés ont été préparés par HENDRICK 1972 (81) selon la technique de WIDE 1969 (82).



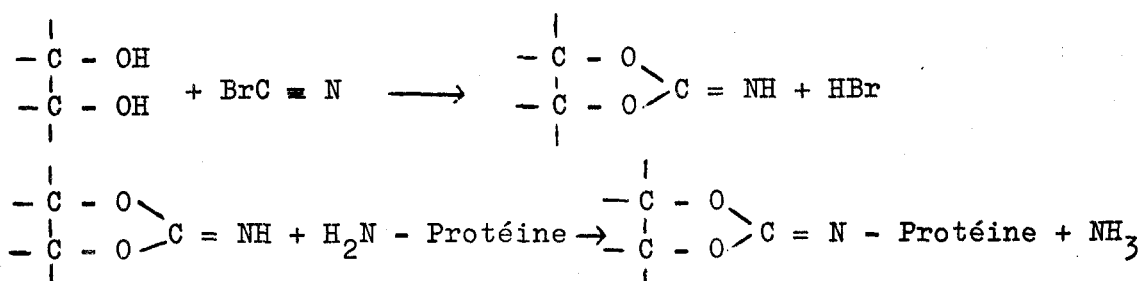
Dans un premier temps, la cellulose est activée par le bromure de cyanogène dans les conditions suivantes : à 200 ml d'eau distillée dans lesquels ont été dissouts préalablement 5 g de bromure de cyanogène, sont ajoutés, sous agitation, 5 g de cellulose. Le pH est amené à 10-11 par une solution de soude normale. Après un temps de réaction de 4 mn, la suspension est filtrée, lavée à l'eau et séchée par un mélange acétone/eau (50 : 50 ; v : v).

Les antigammaglobulines de lapin sont précipitées à partir du sérum de mouton par addition de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (180 mg/ml de sérum). Après agitation pour permettre la dissolution, le mélange est laissé une heure au repos puis centrifugé 5 mn à 3000 rpm. Le précipité est lavé par une solution de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  18 p.100, à nouveau centrifugé et redissout dans 1 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M.

100  $\mu\text{l}$  de gammaglobulines de mouton sont alors mélangés à 200 mg de cellulose activée, ceci dans 1 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. L'agitation se fait par rotation lente durant 24 heures à température ambiante. Puis l'immunoadsorbant est lavé :

- 2 fois par 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M (agitation rotative lente de 20 mn pour chaque lavage puis centrifugation et décantation),
  - 2 fois par 10 ml d'acétate de sodium 0,1 M, pH 4 ou 5 (1 heure et 16 heures),
  - 2 fois par du tampon phosphate pH 7,5 (20 mn),
- ceci afin d'éliminer les protéines non fixées par liaison covalente.

L'immunoadsorbant est remis en suspension dans le tampon à raison de 100 mg/10 ml et conservé à  $-25^\circ\text{C}$  jusqu'à l'emploi. La cellulose activée au bromure de cyanogène est capable de fixer ainsi les globulines à raison de 5 mg/g.



Le dosage radio-immunologique est effectué à température ambiante. Les dilutions sont effectuées dans le tampon phosphate de Sorensen 0,05 M de pH 7,5 additionné d'albumine bovine 5 g/l et d'azide de sodium 0,5 g/l. Le premier système d'incubation est le même que celui décrit pour l'immuno-précipitation à température ambiante :

- 0,1 ml d'antisérum dilué au préalable à
  - 1/1000 pour l'anti FSH ovine
  - 1/8000 pour l'anti LH ovine
- 0,2 ml des dilutions d'hormones de références ou d'échantillons à doser
- 0,1 ml d'hormone marquée diluée (20 000 cpm)
- incubation de 24 heures.

Pour séparer l'hormone marquée libre de l'hormone marquée fixée aux anticorps, on ajoute 0,5 ml des solutions d'immuno-adsorbants (dilués auparavant à 1/200 pour le dosage de la FSH et à 1/800 pour celui de la LH).

Après une agitation rotative de 4 à 5 heures, 2,5 ml de tampon additionné de Tween 20 sont ajoutés dans chacun des tubes qui sont ensuite centrifugés 10 mn à 2500 g. Le surnageant est enlevé. La radioactivité de l'immuno-adsorbant est comptée.

#### 4) Dosage des gonadotrophines dans les sérums de cobayes :

Pour pouvoir doser les gonadotrophines dans les sérums avec une bonne sensibilité, il est nécessaire de modifier la première étape des méthodes précédemment décrites en effectuant une préincubation entre le sérum à doser et

les anticorps avant d'ajouter l'hormone marquée, ceci afin de limiter le rôle d'encombrement des protéines sériques dans la réaction compétitive. Les courbes de références sont alors effectuées dans les mêmes conditions.

Des quantités croissantes de sérums de cobayes, plus ou moins riches en hormones, ont été ajoutées (50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l et 200  $\mu$ l) afin de comparer les courbes obtenues à partir de sérums à celles obtenues à partir des hormones de références.

Par la suite, les dosages seront effectués en double sur 200  $\mu$ l des différents échantillons de sérums.

Le dosage se déroule de la manière suivante : dans un premier temps, à 0,1 ml d'antisérum sont ajoutés 0,2 ml des dilutions d'hormones de références ou de sérums à doser ; suit une préincubation d'un minimum de 4 heures à température ambiante ; puis 0,1 ml d'hormone marquée (20 000 cpm) sont ajoutés - Incubation de 24 heures à température ambiante - Les dosages se déroulent ensuite sans autres modifications.

### III - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17 $\beta$ OESTRADIOL

La méthode utilisée est celle de l'adsorption de l'hormone libre sur un substrat solide, le charcoal-dextran. Ces dosages sont effectués à l'aide du matériel proposé par le CEA.IRE.SORIN (ABRAHAM et coll. 1971 (83), KUTAS et coll. 1972 (84), LINDNER et coll. 1972 (85)).

#### A - Dosage de la progestérone

##### 1) Extraction de la progestérone contenue dans les échantillons de sérum :

Dans des tubes en verre, à 0,1 ml du sérum à doser sont ajoutés 3 ml d'hexane. Les tubes sont bouchés avec des capsules de polyéthylène et agités pendant 2 mn avec un agitateur Vortex. Ils sont ensuite centrifugés 5 mn à 2000 rpm. 1 ml du liquide d'extraction est transféré dans un autre tube en verre et évaporé dans un bain marie à 35-40°C. Pour chaque échantillon de sérum on effectue deux extraits.

##### 2) Dosage :

Les dilutions sont effectuées dans le tampon :

Tris            0,025 M  
lysosymes 0,25 p. 100  
pH 7,4.

La progestérone se dégradant en milieu aqueux, elle est conservée dans une solution éthanolique et ne sera diluée dans le tampon qu'au moment du dosage.

Les résidus secs d'extraction à l'hexane sont res-solubilisés dans 0,3 ml de tampon. Parallèlement, une gamme de tubes contenant des solutions de progestérone standard à différentes dilutions est effectuée en triples exemplaires (0,2 ml de tampon + 0,1 ml d'une solution contenant de 0,25 ng à 8 ng de progestérone/ml). On ajoute ensuite 0,1 ml d'une solution de progestérone tritiée et 0,1 ml d'antisérum.

Les tubes sont agités au Vortex puis mis à incuber à 37°C pendant 30 mn. Ils sont ensuite plongés dans un bain de glace et laissés à incuber 2 heures à 2-4°C ; 0,5 ml d'une suspension de charcoaldextran sont ensuite rapidement additionnés à chaque tube maintenu dans le bain de glace. Après agitation au Vortex et un temps de réaction de 10 mn exactement, les tubes sont centrifugés à 1500 g - 2000 g pendant 10 mn. 0,5 ml du surnageant de chaque tube est prélevé et introduit dans une fiole de comptage contenant 10 ml de liquide à scintillation Soluène-350 (Packard) ou d'une solution de composition :

PPO	7 g
POPOP	0,3 g
Naphtalène	100 g
Dioxane	qsp 1 l.

La radioactivité de chaque fiole est comptée 10 mn dans un compteur  $\beta$  .

B - Dosage de l'oestradiol

1) Extraction de l'oestradiol contenu dans les échantillons de sérum :

Dans les tubes en verre contenant 0,5 ml de sérum à doser, sont ajoutés 3 ml d'éthyl-éther. Les tubes sont bouchés par des capsules en polyéthylène et agités 2 mn au Vortex avant d'être centrifugés 5 mn à 2000 rpm ; 2 ml de chaque extrait sont ensuite transférés dans une autre série de tubes en verre qui sont mis à évaporer dans un bain-marie à 35-40°C.

2) Dosage :

Il s'effectue selon les mêmes modalités que celles décrites pour le dosage de la progestérone.

L'oestradiol, également conservé en solution éthanolique, ne doit être dilué dans le tampon que lors de l'utilisation.

La gamme standard d'oestradiol sera constituée par des tubes dans lesquels sont introduits 0,2 ml de tampon + 0,1 ml d'une solution contenant de 0,125 ng à 4 ng d'oestradiol/ml.

#### IV - ANIMAUX

Le dosage des gonatrophines a été effectué sur des séries d'animaux lors de différentes conditions physiologiques (période post-natale, cycle oestral) ou expérimentales (castration, injections de LRF). Ces animaux sont gardés dans des conditions d'éclairément constantes (L : 0 = 14 : 10) à  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

##### A - Période post-natale

80 cobayes nouveau-nés mâles et femelles ont été sacrifiés par décapitation à des temps variant de 3 heures à 23 jours après la naissance. Les animaux ont été sacrifiés le matin à 10h30. Leur sang, récolté individuellement, est laissé pendant un temps minimum de 30 mn à  $4^{\circ}\text{C}$  pour que la coagulation s'effectue. Après centrifugation le sérum est prélevé et conservé à  $- 20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment du dosage.

##### B - Cycle oestral

Les transformations que subissent la muqueuse vaginale et les ovaires au cours des différentes phases du cycle oestral chez le cobaye ont été décrites précédemment avec précision par LEONARDELLI 1961-1962 (86, 87, 88).

Notre étude a porté sur 60 femelles d'environ 700 g qui ont été suivies dans un premier temps par la méthode des frottis vaginaux afin de choisir le moment du sacrifice. Les frottis, préalablement fixés par un mélange alcool/éther (1 v : 1 v) sont colorés de la façon suivante :

- alcool 70° (plonger 10 fois)
- eau distillée (plonger 10 fois)
- Hématoxyline au sulfate de zinc de PAPAMILTIADES (3 minutes)
- eau courante (rinçage attentif)
- eau distillée (plonger 10 fois)
- alcool 70° (plonger 10 fois)
- alcool 95° (plonger 10 fois)
- Solution de SHOOR"SIIII" de composition :

alcool à 50°	100 ml
Biebrich Ecarlate hydrosoluble	0,5 g
Orangé G	0,25 g
Fast green FCF	0,075g
Acide phosphotungstique	0,5 g
Acide phosphomolybdique	0,5 g
Acide acétique glacial	1 ml

Coloration pendant 4 à 6 minutes.

- alcool à 95° (plonger 10 fois)
- alcool absolu I (plonger 10 fois)
- alcool absolu II (plonger 10 fois)
- toluène (30 secondes).

Le montage des lamelles s'effectue ensuite à l'Eukitt.

L'observation au microscope montre schématiquement les images suivantes : en prooestrus I, de petites cellules épithéliales à rapport nucléoplasmique élevé et à cytoplasme basophile ; en prooestrus II, de grandes cellules basophiles, muqueuses, à noyau le plus souvent pycnotique ; en oestrus pré-ovulatoire apparaissent des cellules éosinophiles à noyau pycnotique provenant de la desquamation de la couche kératinisée ; en oestrus postovulatoire, ces cellules sont plissées et s'ag-



glutinent formant des "placards" ; en postoestrus I réapparaissent des cellules basophiles qui sont de deux types : des petites basophiles provenant des couches profondes mais surtout des grandes basophiles muqueuses provenant de la desquamation de l'endocol qui s'effectue plus tardivement que celle du vagin ; on observe également de nombreux polynucléaires ; en postoestrus II, les cellules éosinophiles ont totalement disparu tandis que les polynucléaires envahissent les cellules basophiles.

Le 1er jour d'ouverture vaginale s'effectue assez tardivement chez nos cobayes : frottis de fin de prooestrus (l'épithélium vaginal montrera le plus souvent déjà un début de kératinisation) ; ce jour est appelé jour I du cycle.

Les frottis vaginaux ne permettent en fait d'établir qu'une chronologie approximative aussi, pour déterminer avec précision le moment exact du sacrifice, il est nécessaire de prélever les deux ovaires et le vagin de chaque animal et d'en effectuer l'examen histologique.

Les organes sont fixés 3 à 4 jours dans un mélange de BOUIN-HOLLANDE (1918) sans acide acétique :

acide pièrique	4 g	
acétate de cuivre	2,5 g	
H <sub>2</sub> O	100 ml	
formol neutre	10 ml	} ajoutés extemporanément
sublimé (solution aqueuse saturée de HgCl <sub>2</sub> )	10 ml	

Les pièces sont ensuite deshydratées pendant 24 heures dans l'alcool à 95° (2 bains) puis à nouveau 24 heures dans l'alcool absolu (3 bains). L'alcool est éliminé par 3 passages successifs de 20 mn dans des flacons de toluène. Les pièces sont alors imprégnées par de la paraffine maintenue à 55°C dans une étuve (1er bain : 2 heures ; 2ème bain : 4 heures) avant d'être incluses. Les blocs refroidis sont coupés au microtome

en coupes de 10 microns d'épaisseur. Une coupe sur dix sera retenue, étalée et collée sur lame par de l'eau albumineuse.

Le déparaffinage et la coloration de MASSON s'effectuent de la façon suivante :

déparaffinage et réhydratation :

- toluène : 3 bains de 15 mn
- alcool 95° : 3 bains de 5 mn
- alcool 70° iodé : 5 mn (élimination des cristaux de mercure)
- alcool 70° : 5 mn
- rinçage à l'eau courante jusqu'à blanchissement des coupes
- rinçage à l'eau distillée

coloration :

- Hématoxyline de GROAT : 15 mn
  - [ Alun de fer 2 g
  - [ H<sub>2</sub>O 100 ml
  - [ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,6 ml
- [ alcool 95° 100 ml
- [ Hématoxyline 1 g
- lavage à l'eau courante : 5 mn
- H<sub>2</sub>O ammoniaquée (2 p. 100) : passage rapide
- Fuchsine Ponceau : 3 mn
  - Ponceau S 2 g
  - Fuchsine acide 1 g
  - H<sub>2</sub>O 300 ml
  - Acide acétique 2 ml
- Acide phosphomolybdique (2 p. 100) : passage rapide
- Orangé G : 5 mn
  - Orangé G 8 g
  - H<sub>2</sub>O 400 ml
  - Acide phosphomolybdique 16 g
- H<sub>2</sub>O acétifiée (1 p. 100) : passage rapide

- Vert FCF : 2 mn
  - Vert solide FCF 2 g
  - H<sub>2</sub>O 200 ml
  - Acide acétique 1 ml
- H<sub>2</sub>O acétifiée (1 p. 100) : passage rapide
- Alcool absolu : 2 bains de 5 mn
- Toluène : 2 bains de 5 mn.

Les lamelles sont montées à l'Eukitt. Après séchage à l'étuve, l'observation microscopique peut être effectuée.

Lors du prooestrus I, on observe une prolifération des cellules de l'épithélium malpighien de la muqueuse vaginale. Le prooestrus II est marqué par un développement de la couche muqueuse superficielle ; il y a également une prolifération accentuée des cellules de l'épithélium malpighien formant des replis qui soulèvent l'assise muqueuse. Cet épithélium a atteint sa hauteur maximale d'environ 200 microns. Le début de l'oestrus est marqué par la kératinisation de la couche moyenne de l'épithélium vaginal. Durant l'oestrus vont s'effectuer successivement : la desquamation de la couche muqueuse, la dissociation puis la desquamation de la couche kératinisée et enfin l'exfoliation des cellules précornées sous-jacentes (l'ovulation ayant lieu lors du décollement de la couche kératinisée). Lors du postoestrus I, l'épithélium, réduit à une épaisseur de 50 microns, est envahi par des polynucléaires. Parallèlement, dans les coupes d'ovaires, nous observons des corps progestatifs à cavité centrale importante sans organisation fibroblastique et à paroi mince. Au postoestrus II, la cavité centrale des corps progestatifs est envahie par des fibrocytes et la couche glandulaire est épaissie ; l'épithélium vaginal atteint son minimum d'épaisseur (15 à 20 microns), par exfoliation du corps muqueux de Malpighi. La fin du postoestrus est marquée par l'apparition d'une couche muqueuse superficielle à plages discontinues. C'est à ce moment que se ferme la membrane vaginale.

C - Castration

150 cobayes tricolores mâles de 450 g sont castrés bilatéralement après anesthésie par injection intrapéritonéale de 0,85 ml d'uréthane à 20 p. 100 et de 0,15 ml de Nembutal. Les animaux sont sacrifiés par décapitation, à 10h30 le matin, dans des délais variant de 24 heures à 97 jours après la castration. Leur sang est récolté individuellement. Après coagulation à 4°C et centrifugation, les sérums recueillis sont conservés congelés à - 20°C jusqu'au moment du dosage.

D - Injection de LRF

100 µg de LRF synthétique (Hoechst Frankfurt) ont été administrés par injection intrapéritonéale à des cobayes mâles de 350 g. Les animaux ont été sacrifiés à des temps variant de 30 mn à 2h30 après l'injection. Les dosages radio-immunologiques de LH, FSH et testostérone sont effectués sur les sérums.

R E S U L T A T S

---oo0oo---

## I - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES

### A - Etablissement des courbes de références

#### 1) Expression des résultats :

Les modifications du pourcentage d'hormone marquée fixée aux anticorps sous l'influence d'addition d'hormone froide sont exprimées par le rapport :

$$\frac{B}{B_0} \times 100$$

dans lequel  $B_0$  est la radioactivité liée aux anticorps en l'absence de toute hormone froide et  $B$ , la radioactivité liée en présence de  $x$  ng d'hormone froide.

Ceci est couramment représenté sur un graphique dont l'une des échelles est logarithmique, ce qui permet l'obtention d'une portion de courbe pratiquement linéaire.

#### 2) Antisérums :

##### a) Systèmes homologues :

En l'absence de toute hormone froide, l'antisérum anti FSH de rat, utilisé à la dilution de 1/3500 fixe 25 à 32 p. 100 de la FSH de rat marquée à l' $^{125}\text{I}$  ; l'antisérum anti LH de rat, à la dilution de 1/150000, fixe 32 p. 100 de la LH de rat marquée.

##### b) Systèmes hétérologues :

En l'absence d'hormone froide, l'antisérum anti FSH ovine fixe 10 à 13 p. 100 de la FSH de rat marquée

à  $1 \cdot 125\text{I}$  lorsqu'il est utilisé à la dilution de 1/8000 et 19 à 22 p. 100, à la dilution de 1/4000.

L'anti FSH humaine en fixe 7 p. 100 à la dilution de 1/40000 et 11 p. 100 à la dilution de 1/20000.

L'antisérum anti LH ovine, à la dilution de 1/32000, fixe 24 à 26 p. 100 de la LH de rat marquée à  $1 \cdot 125\text{I}$ .

### 3) Reproductibilité :

Méthode du calcul du coefficient de variation, soit :

- la moyenne  $\bar{X}$  : somme des valeurs X divisée par le nombre n de valeurs (estimation de la moyenne  $\mu$  théorique)

$$\bar{X} = \sum X/n$$

- x : écart d'une valeur à la moyenne

$$X - \bar{X} = x$$

- la variance  $S^2$  (estimation de la variance  $\sigma^2$  théorique)

$$S^2 = \frac{\sum x^2}{n-1} \text{ (nombre de degrés de liberté)}$$

- l'écart-type ou déviation standard S (estimation de  $\sigma$ )

$$S = \sqrt{S^2}$$

- le coefficient de variation V

$$V = \frac{100 S}{\bar{X}} \text{ p. 100}$$

Les coefficients de variations intrasystèmes, c'est-à-dire ceux qui concernent la répétition du dosage d'un même échantillon en utilisant la même hormone marquée et le même anticorps se situent entre 1,3 et 4,2 p. 100, avec des valeurs moyennes de 2,9 p. 100 pour le dosage de FSH et de 2,65 p. 100 pour celui de LH, ce qui représente une très bonne reproductibilité.

Les coefficients de variations intersystèmes sont nettement plus élevés, pour cette raison, tous les échantillons concernant la même expérience et devant être comparés les uns aux autres sont introduits dans un même dosage.

4) Sensibilité :

La sensibilité des dosages sera définie par la plus petite quantité d'hormone froide pouvant induire une diminution statistiquement significative du pourcentage de l'hormone marquée fixée aux anticorps (FELDMAN et ROBBARD 1971 (89), MIDGLEY et coll. 1969 (90)).

Le calcul statistique pour comparer deux séries de mesures A et B est effectué suivant la méthode du test t de Student-Fisher avec :

$$S^2 = \frac{(n_A - 1) S_A^2 + (n_B - 1) S_B^2}{n_A + n_B - 2 \text{ (nombre de degrés de liberté)}}$$

$$\text{et } t = (\bar{X}_A - \bar{X}_B) \sqrt{\frac{n_A n_B}{S^2 (n_A + n_B)}}$$

La diminution est dite "significative" si la probabilité pour que B soit identique à A n'est pas supérieure à 5 p. 100 ( $P \leq 0,05$ ).

La sensibilité ainsi définie est de l'ordre de 0,95 ng de NIAMD rat FSH RP<sub>1</sub> pour le dosage de la FSH et de 0,22 ng de NIAMD rat LH RP<sub>1</sub> pour le dosage de la LH. Ces valeurs correspondent à des diminutions de 5 à 10 p. 100, suivant les dosages, de la radioactivité fixée à l'anticorps.



B - Obtention d'une réaction croisée entre les gonadotrophines de rat et celles du cobaye

Dans un premier temps, les essais de mise au point des dosages avaient été effectués sur des extraits acétoniques hypophysaires de cobayes non purifiés.

1) Dosage de la FSH

a) Système homologue de rat :

L'addition d'extrait hypophysaire de cobaye, même en quantités très élevées (5 µg), ne provoque pas de décroissance de la radioactivité fixée aux anticorps. L'antisérum anti FSH de rat possède une affinité très grande pour la FSH marquée de rat et la FSH de cobaye contenue dans la poudre acétonique ne provoque pas de compétition pour se fixer à ces anticorps. Ce système est donc inutilisable pour le dosage de la FSH de cobaye.

b) Systèmes hétérologues :

- avec des antisérums anti FSH ovine : système mis au point pour le dosage de la FSH de rat par HENDRICK et coll. 1971 (75).

Deux antisérums anti FSH ovine contenant des anticorps capables de se lier aux FSH de différents mammifères ont été utilisés. Un seul a donné des résultats satisfaisants pour le dosage de la FSH de cobaye. L'addition d'extrait hypophysaire de cobaye provoque alors une décroissance de la radioactivité fixée aux anticorps et la courbe de décroissance obtenue est parallèle à celle obtenue par addition d'hormone de référence de rat (Fig. n° 6 p.53) ; ceci indique que la réaction croisée entre la FSH de cobaye de l'extrait hypophysaire et la

FSH de rat est complète. Les résultats des dosages peuvent donc être exprimés en unités pondérales des préparations standards. L'extrait antéhypophysaire de cobayes âgés de 10 à 30 jours contient le plus souvent l'équivalent de 10  $\mu\text{g}$  de NIAMD rat FSH  $\text{RP}_1/\text{mg}$ . Chez certains jeunes (préparations d'extraits à partir des adénohypophyses de très petits nombres de cobayes (6)), il est possible de trouver une activité immunologique atteignant 25  $\mu\text{g}$  de NIAMD rat FSH  $\text{RP}_1/\text{mg}$ .

D'autre part, dans ce système, nous avons également obtenu une réaction immunologique croisée complète avec un extrait hypophysaire de canard, CROIX et coll. 1974 (91) (Fig. n°3 p. 47) ; il est cependant nécessaire d'ajouter des quantités 130 fois plus importantes de poudre acétonique pour obtenir le même taux de décroissance que celui de la courbe de référence. L'extrait hypophysaire de canard contient donc approximativement 6 à 8  $\mu\text{g}$  de NIAMD rat FSH  $\text{RP}_1/\text{mg}$ . Nous notons également que la sous-unité  $\alpha$  de l'HCG humaine et  $\beta$  de la FSH humaine n'entraînent aucune inhibition de la fixation de la FSH marquée de rat aux anticorps anti FSH ovine. La LH ovine, utilisée comme contrôle, n'entraîne une inhibition de cette réaction que pour des quantités importantes, ceci en raison de sa contamination par la FSH.

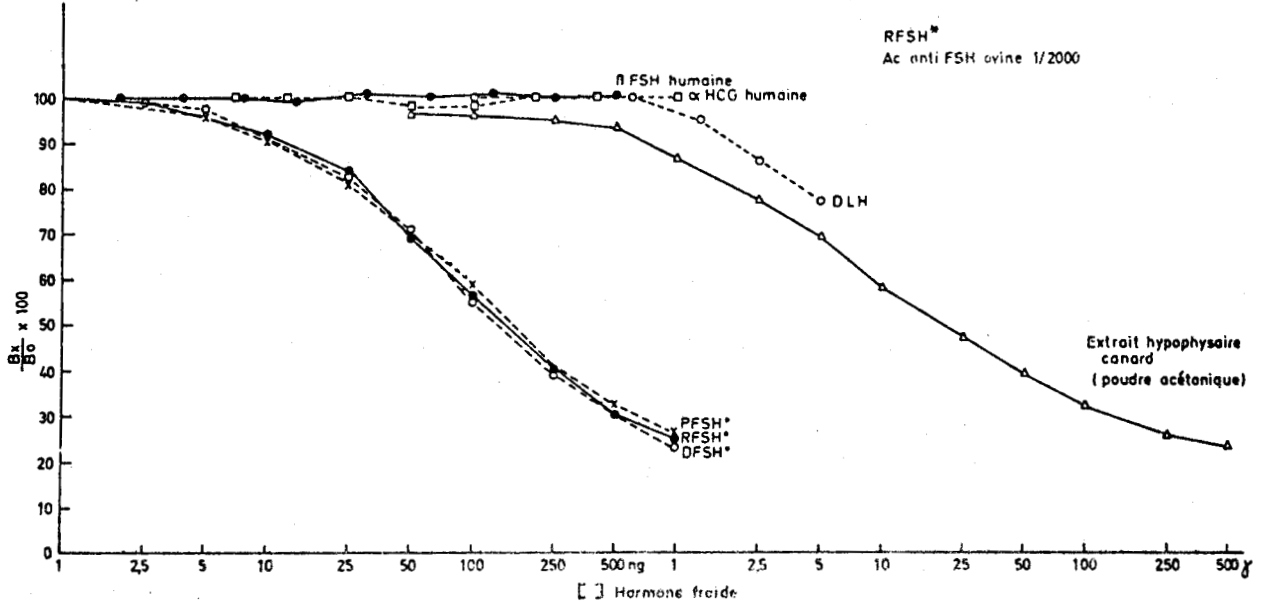


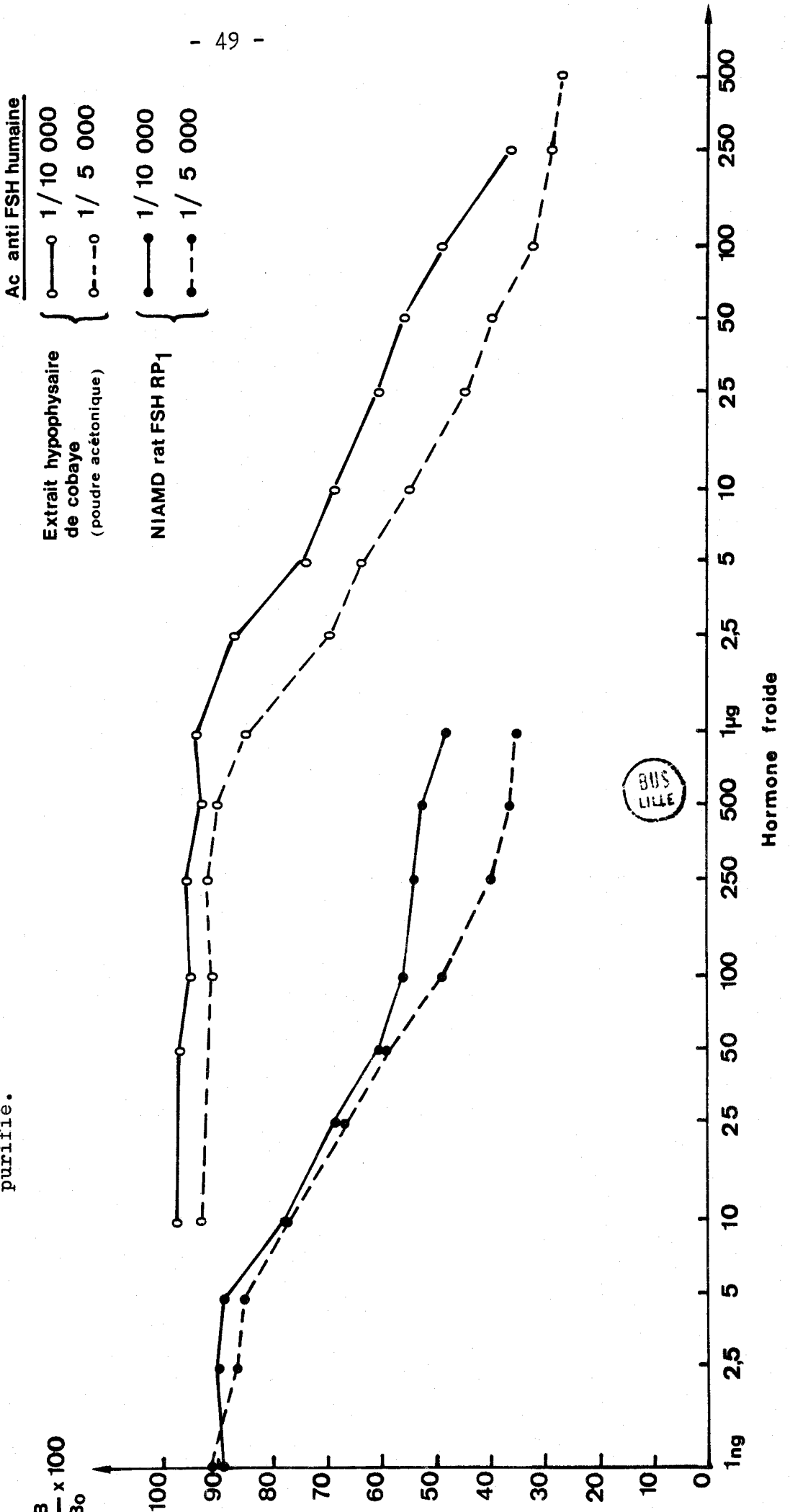
Figure n° 3 : Inhibition complète de la fixation de la FSH marquée de rat aux anticorps anti FSH ovine par la FSH de rat, de porc, de mouton et de canard. La sous-unité  $\alpha$  de HCG et  $\beta$  de FSH n'entraîne aucune inhibition. La LH ovine inhibe cette réaction pour des quantités importantes en raison de sa contamination par la FSH.



- avec un antisérum anti FSH humaine :

Nous constatons également une réaction croisée complète avec l'extrait hypophysaire de cobaye (Fig. n° 4 p. 49). Ce système pourrait donc être éventuellement utilisé ; toutefois, les courbes dont la pente reste faible, montrent qu'aux dilutions utilisées dans ces essais, la sensibilité est insuffisante. Il faudrait donc, dans un premier temps, établir la dilution de l'antisérum qui permettrait, en l'absence de toute hormone froide, une fixation de l'ordre de 30 à 50 p. 100 de l'hormone marquée, zone optimum de sensibilité.

Figure n° 4 : Déplacement de la RFSH\* fixée aux anticorps anti FSH humaine par la RFSH non marquée et par l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié.



2) Dosage de la LH

a) Système homologue de rat :

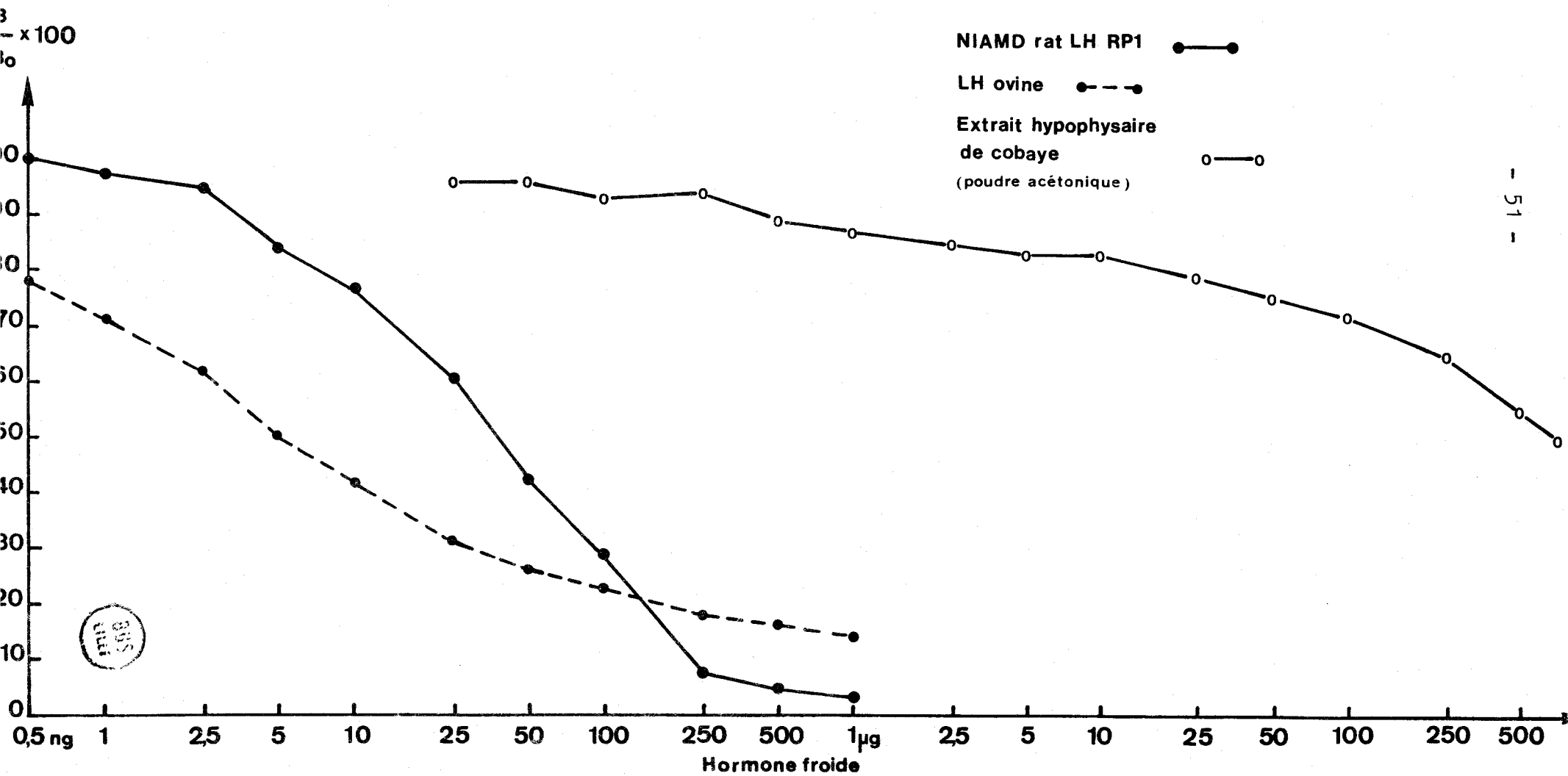
L'addition d'extrait hypophysaire de cobaye ne provoque une décroissance significative de la radio-activité fixée aux anticorps que pour des valeurs élevées (Fig. n° 5 p. 51), en effet la pente de la courbe est différente de celle obtenue par l'addition de LH de rat froide, montrant ainsi une affinité moins grande de cet antisérum pour la LH de cobaye que pour la LH de rat. Nous ne retiendrons donc pas ce système de dosage.

b) Systèmes hétérologues avec des antisérums anti LH ovine :  
mis au point par NISWENDER et coll. 1968 (92, 93) pour le dosage de la LH chez différents mammifères (bovins, porcins, rats).

Des essais ont été effectués avec cinq antisérums différents. Quatre d'entre eux ont été utilisés avec succès mettant en évidence une réaction croisée complète entre la LH de rat et la LH de cobaye contenue dans l'extrait hypophysaire (Fig. n° 7 p. 54). Cet extrait contient l'équivalent de 60  $\mu$ g de NIAMD rat LH RP<sub>1</sub>/mg. Nous n'avons cependant retenu qu'un seul antisérum afin d'effectuer les dosages ultérieurs dans des conditions reproductibles.

L'extrait hypophysaire de canard ne présente aucune réaction croisée dans ce système.

Figure n° 5 : Déplacement de la RLH\* fixée aux anticorps anti LH de rat par la RLH non marquée, par la LH ovine et par l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié.



C - Dosage des fractions purifiées

Les résultats de ces dosages sont réunis dans le tableau III p. 56.

1) Dosage de la FSH

Les préparations partiellement purifiées de FSH de cobaye (CFSH DE<sub>1</sub> et CFSH A<sub>3</sub>) diminuent la radioactivité fixée aux anticorps en présentant une courbe de décroissance dont la pente est identique à celle de la courbe de référence de rat (Fig. n° 6 p. 53) ; la radioactivité restant fixée quelle que soit la quantité de produit ajoutée, a la même valeur que la radioactivité résiduelle de la courbe obtenue par addition de FSH de rat non marquée. La réaction croisée est donc complète. L'activité immunologique de ces préparations reste cependant inférieure à celle de l'hormone de référence ; ces fractions ne réagissent pas (CFSH DE<sub>1</sub>) ou ne réagissent qu'à des concentrations très élevées (CFSH A<sub>3</sub>) dans le système de dosage de LH ; le rapport des quantités de CFSH A<sub>3</sub> entraînant une réduction de 50 p. 100 de la fixation de la LH marquée aux anticorps anti LH et de la FSH marquée aux anticorps anti FSH est de 10.

2) Dosage de la LH

La réaction croisée entre la LH de rat et la fraction LH B<sub>2</sub> de cobaye est complète (Fig. n° 7 p. 54). Cette fraction ne réagit dans le système de dosage de FSH qu'à des concentrations très élevées. En effet, le rapport des quantités de CLH B<sub>2</sub> entraînant une réduction de 30 p. 100 de la fixation de la FSH marquée aux anticorps anti FSH et de la LH marquée aux anticorps anti LH est de 1236. Il est intéressant de noter que la préparation de CLH B<sub>2</sub> est plus immunoréactive que la préparation de référence NIAMD rat LH RP<sub>1</sub>.



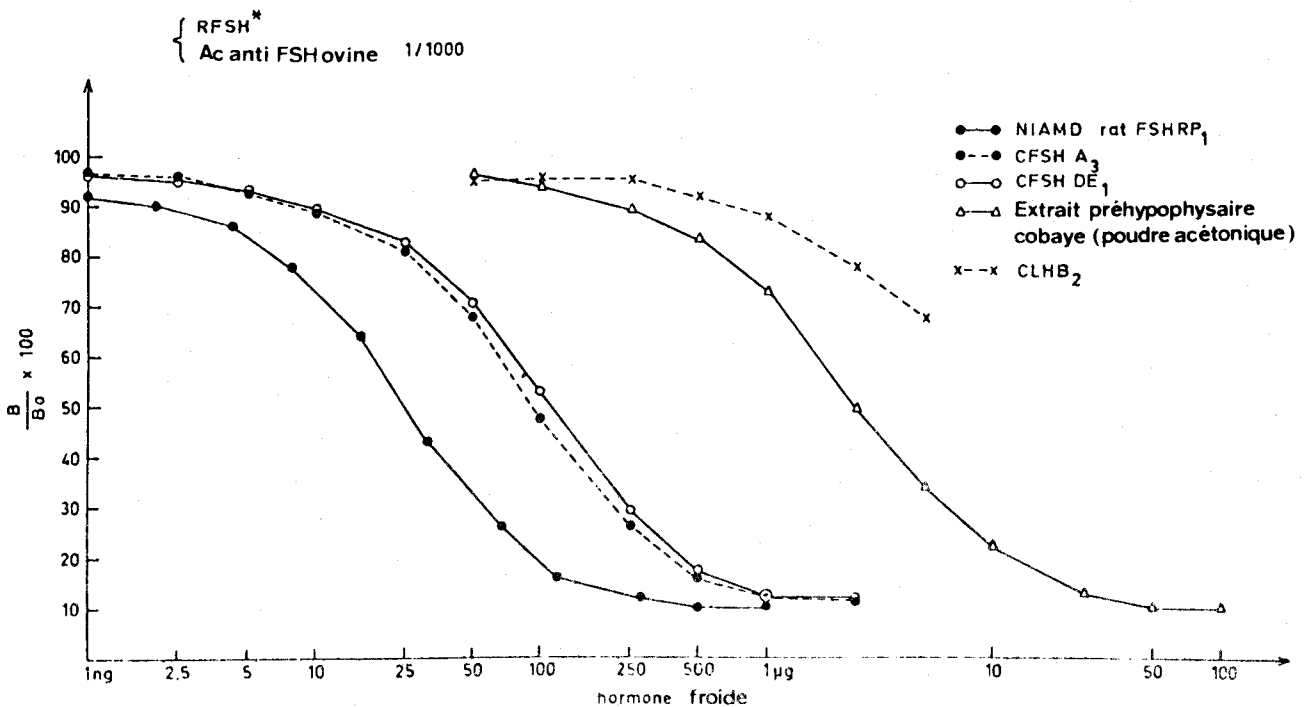


Figure n° 6 : Déplacement de la RFSH\* fixée aux anticorps anti FSH ovine , par la RFSH non marquée et par les extraits antéhypophysaires de cobaye. Les fractions riches en FSH de cobaye inhibent complètement la fixation de la RFSH\* aux anticorps anti FSH ovine. La fraction LH n'inhibe cette réaction que pour des concentrations élevées.

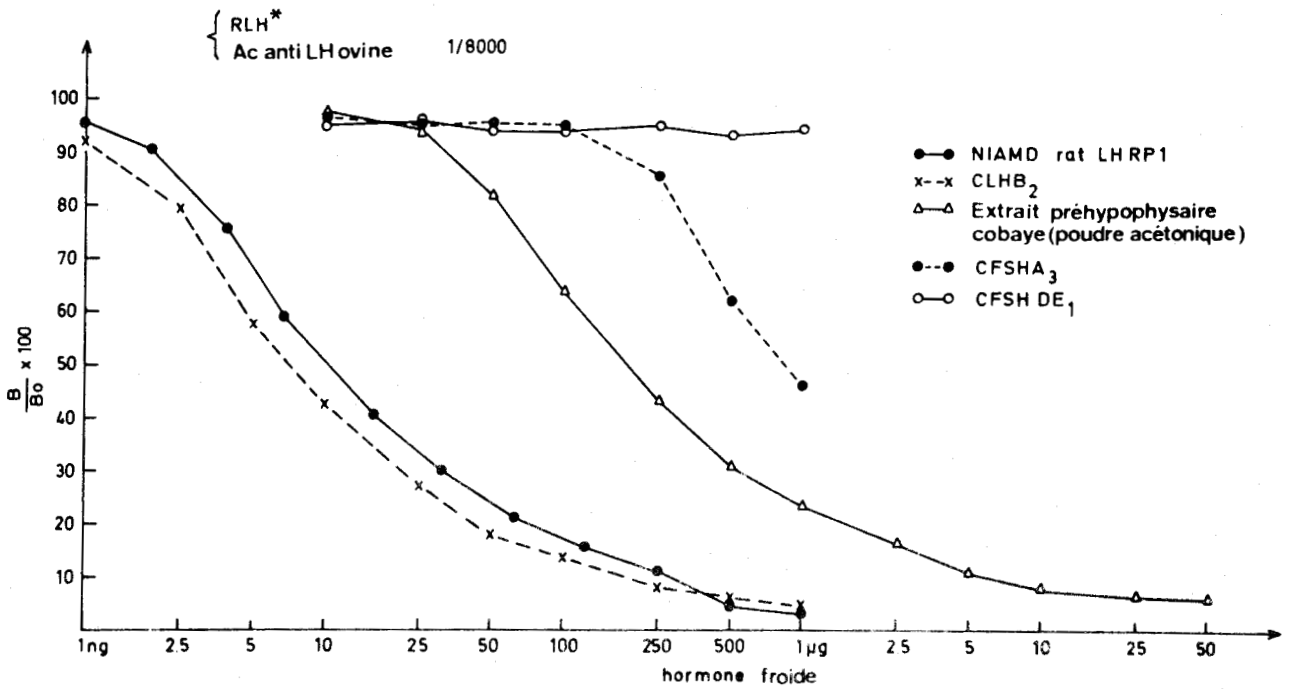


Figure n° 7 : Déplacement de la RLH\* fixée aux anticorps anti LH ovine par la RLH non marquée et par les extraits antéhypophysaires de cobaye. La fraction riche en LH de cobaye inhibe complètement la fixation de la RLH\* aux anticorps anti LH ovine. A des concentrations importantes, l'une des fractions enrichies en FSH inhibe également cette réaction en raison de sa contamination en LH.



D - Dosage des gonadotrophines dans les sérums de cobayes

Dans nos dosages, les courbes obtenues à partir de dilutions de sérums de cobayes (tant pour les mâles et femelles adultes que pour les jeunes mâles et femelles impubères) sont parallèles à celles obtenues à partir des extraits hypophysaires (Fig. n° 8 p. 57, Fig. n° 9 p. 58). Il y a donc analogie immunologique entre la FSH et la LH hypophysaires et la FSH et la LH sériques.

Il est possible de détecter 4,3 ng/ml de FSH et 1,1 ng/ml de LH.

E - Représentation graphique des modifications des taux sériques en fonction de l'état physiologique ou expérimental des animaux

Les courbes ont été représentées, soit avec l'amplitude maximale pour chaque valeur, lorsque le nombre d'animaux par point de courbe est peu élevé (cycle oestral, cobayes impubères) ; soit avec l'intervalle de confiance à 5%<sup>(de risque)</sup> (P = 0,05) (cobayes castrés), calculé par la méthode de Student-Fisher : soit l'erreur type de la moyenne  $S_m = S/\sqrt{n}$ , la valeur t 0,05 pour (n - 1) degrés de liberté, on assigne à la moyenne inconnue  $\mu$ , l'intervalle de confiance à 5 % :  $\bar{X} \pm t \times S_m$ .

Fraction	Poids (mg/g poudre acétonique)	F S H			L H		
		Equivalent NIAMD rat FSHRP <sub>1</sub> (µg/mg)	Activité spécifique	Rendement	Equivalent NIAMD rat LHRP <sub>1</sub> (µg/mg)	Activité spécifique	Rendement
poudre acétonique (770 pré- hypophysés)	1000	7 - 10	0,007-0,01	100	30 - 60	0,03-0,06	100
	8,8 - 19,5	70	0,07	8,6-13,7	330 - 450	0,45	13 - 15
CM <sub>1</sub>	1,8 - 2,4	152	0,15	5,2	20 - 70	0,02-0,07	0,06
CM <sub>2</sub>	2,2 - 2,5	3,8	0,004	0,14	930 - 1200	1,2	10
CFSH DE <sub>1</sub>	0,35- 0,6	170 - 225	0,2	2	-	-	-
DE <sub>2</sub>	0,9 - 1,2	-	-	-	-	-	-
CFSH A <sub>3</sub>	0,8	250 - 300	0,3	3,4	12,5	0,01	0,03
CLH B <sub>2</sub>	2	2,9	0,003	0,1	1500	1,5	10

Tableau III : Activités (déterminées par dosages radioimmunologiques) et poids des fractions de gonadotrophines extraites à partir d'antéhypophysés de cobayes.



Figure n° 8 : Déplacement de la RFSH\* fixée aux anticorps anti OFSH par la RFSH non marquée, l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié et des sérums de cobayes progressivement dilués.

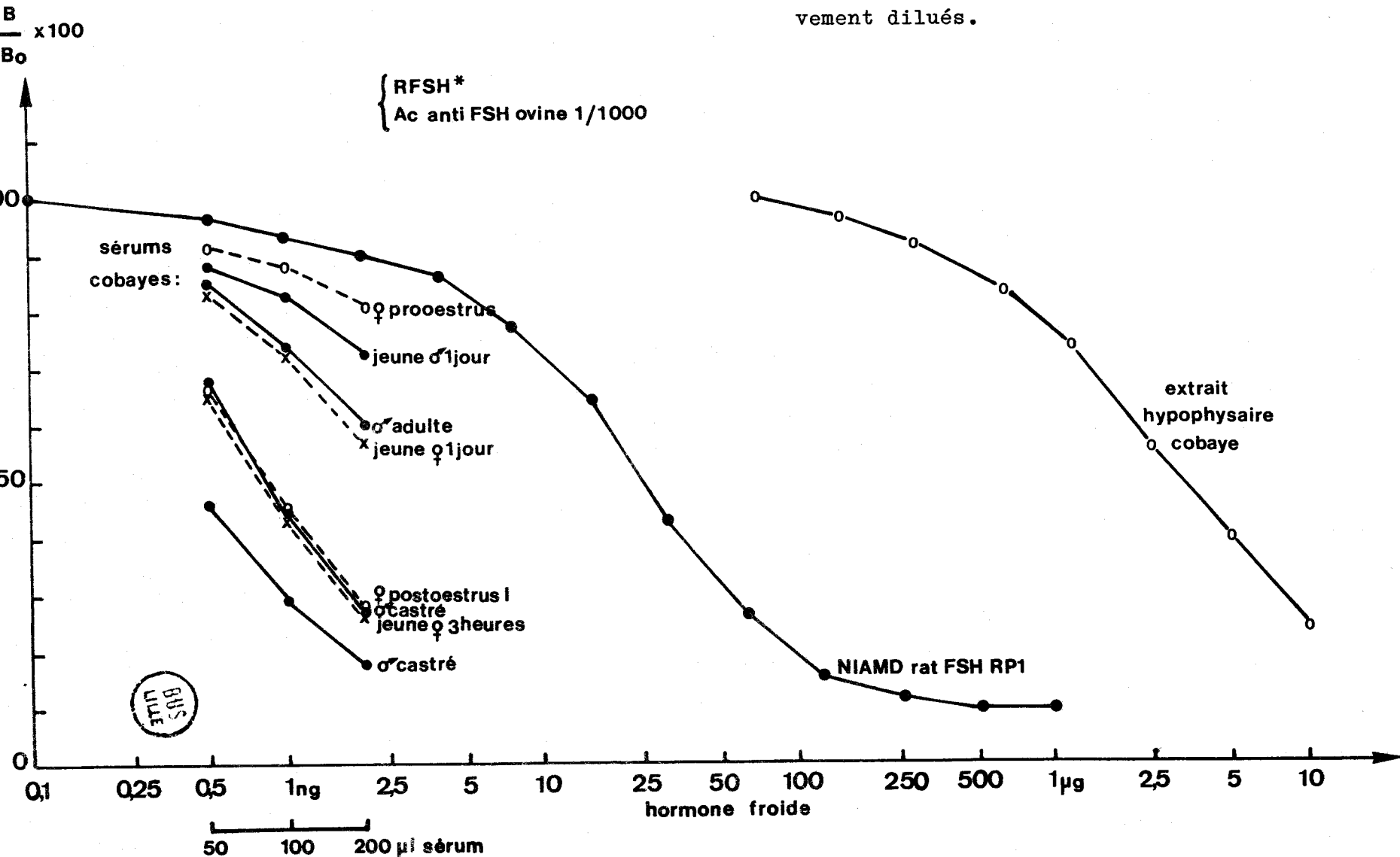
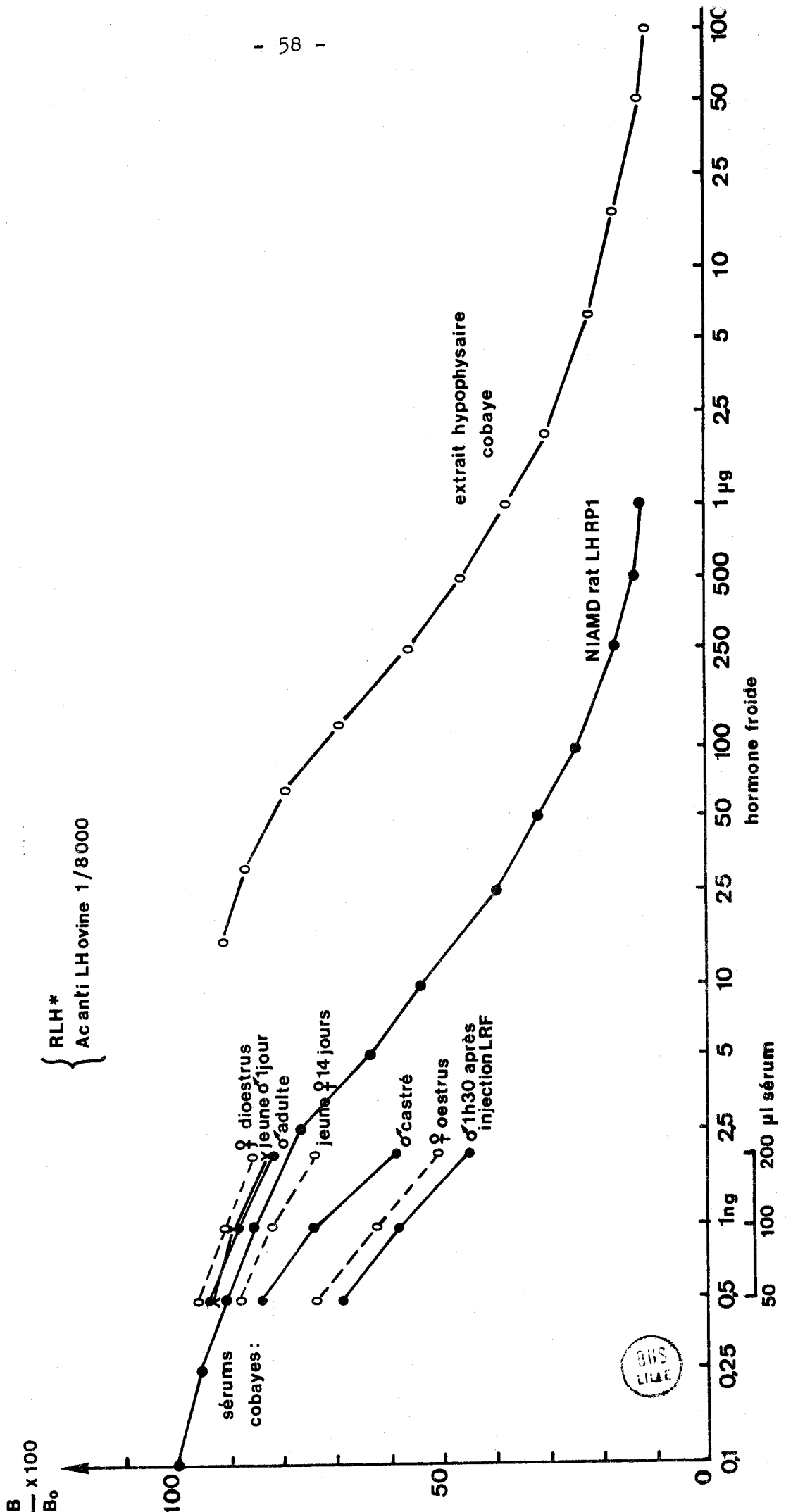


Figure n° 9 : Déplacement de la RLH\* fixée aux anticorps anti OLH par la RLH non marquée, l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié et des sérums de cobayes progressivement dilués.



## II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17 $\beta$ OESTRADIOL

### A - Dosage de la progestérone

La progestérone est extraite du sérum par l'hexane avec un rendement de 80 p. 100 (soit "extraction yield" YF = 0,80).

La concentration de l'échantillon va être calculée, par comparaison à la courbe standard, de la façon suivante :

$$\begin{array}{l} \text{nombre de pg de} \\ \text{progestérone lus} \\ \text{sur la courbe} \\ \text{standard corres-} \\ \text{pondant au nombre} \\ \text{de cpm.} \end{array} \times \frac{\text{volume de solvant} \\ \text{d'extraction}}{\text{volume d'extrait} \\ \text{introduit dans le} \\ \text{dosage.}} \times \frac{1}{\text{volume de sérum} \\ \text{utilisé pour} \\ \text{l'extraction.}} \times \frac{1}{\text{YF}} =$$

X pg de progestérone / ml de sérum

soit, dans nos dosages :

$$x \times \frac{3}{1} \times \frac{1}{0,1} \times \frac{1}{0,8} = X \text{ pg/ml}$$

L'interférence avec la 17  $\alpha$ -hydroxyprogestérone n'est que de 4 p. 100. Les interférences des autres stéroïdes sont très faibles. Les coefficients de variations intrasystèmes sont de l'ordre de 4 p. 100. La fixation de la progestérone tritiée à l'antisérum, en l'absence de toute hormone froide, est de 32 p. 100. Des quantités de 5 à 400 pg de progestérone peuvent être déterminées avec précision par cette méthode ; on choisit donc les volumes de sérum utilisés pour l'extraction et les volumes d'extraits introduits dans le dosage en fonction des

concentrations présumées en progestérone de ces sérums, suivant les conditions physiologiques de l'animal, ceci de manière à obtenir une radioactivité correspondant à des valeurs de 5 à 400 pg de la courbe standard.

#### B - Dosage de l'oestradiol

L'oestradiol est extrait des sérums par l'éthyl-éther avec un rendement voisin de 100 p. 100 ( $YF = 1$ ). Les interférences des autres stéroïdes (oestrone, oestriol) sont de l'ordre de 1 p. 100 et peuvent être négligées.

Le calcul de la concentration de l'échantillon par rapport à la courbe standard s'effectue de la même façon que celui décrit pour le dosage de la progestérone, soit, dans nos dosages :

$$\begin{array}{l} \text{x pg d'oestradiol} \\ \text{lus sur la courbe} \\ \text{standard} \end{array} \times \frac{3}{2} \times \frac{1}{0,5} \times \frac{1}{1} = \text{X pg d'oestradiol/ml} \\ \text{de sérum.}$$

Les coefficients de variations intrasystèmes sont de l'ordre de 3,6 à 4 p. 100. L'oestradiol tritié se fixe à l'antisérum, en l'absence d'hormone froide, à raison de 37 à 45 p. 100. Des quantités de 5 à 400 pg d'oestradiol peuvent être déterminées avec précision. Les volumes de sérums utilisés pour les dosages seront choisis, comme pour la progestérone, en fonction de l'état physiologique des animaux.



### III - PERIODE POST-NATALE

#### A - LH :

Chez les jeunes cobayes mâles (Fig. n° 10 -a- p. 62) les taux de LH se situent entre 3,5 et 7 ng/ml à l'exception toutefois des premières heures après la naissance où ils peuvent être un peu plus élevés, des 8ème et 9ème jours où nous observons des valeurs de 11,5 à 14 ng/ml et des jours suivant le 20ème jour où les taux augmentent également.

Chez les jeunes femelles (Fig. n° 10 -b- p. 62) les taux de LH oscillent en moyenne entre 1,7 et 6,6 ng/ml. Nous notons des variations individuelles très importantes ainsi que des valeurs plus élevées au 15ème jour atteignant 13 ng/ml, mais nous n'avons pas suffisamment de jeunes femelles de cet âge pour que cette augmentation soit significative.

#### B - FSH :

Chez les cobayes mâles (Fig. n° 11 -a- p. 63) de la naissance au 9ème jour les taux de FSH se situent entre 25 et 68 ng/ml ; à partir du 10ème jour ils augmentent pour atteindre une valeur moyenne de 100 ng/ml à laquelle ils se maintiennent en plateau jusqu'au 23ème jour.

A la naissance, les taux de FSH des cobayes femelles (Fig. n° 11 -b- p. 63) sont élevés (180-310 ng/ml). Ces taux décroissent rapidement jusqu'à 45 ng/ml. Nous observons à nouveau des valeurs élevées du 7ème au 10ème jour : 100 à 230 ng/ml (poids moyens des animaux : 140 à 170 g) (Fig. n° 12 p. 64), puis du 12ème au 23ème jour les valeurs retombent à 50 ng/ml (poids moyens des animaux : 190 à 210 g).

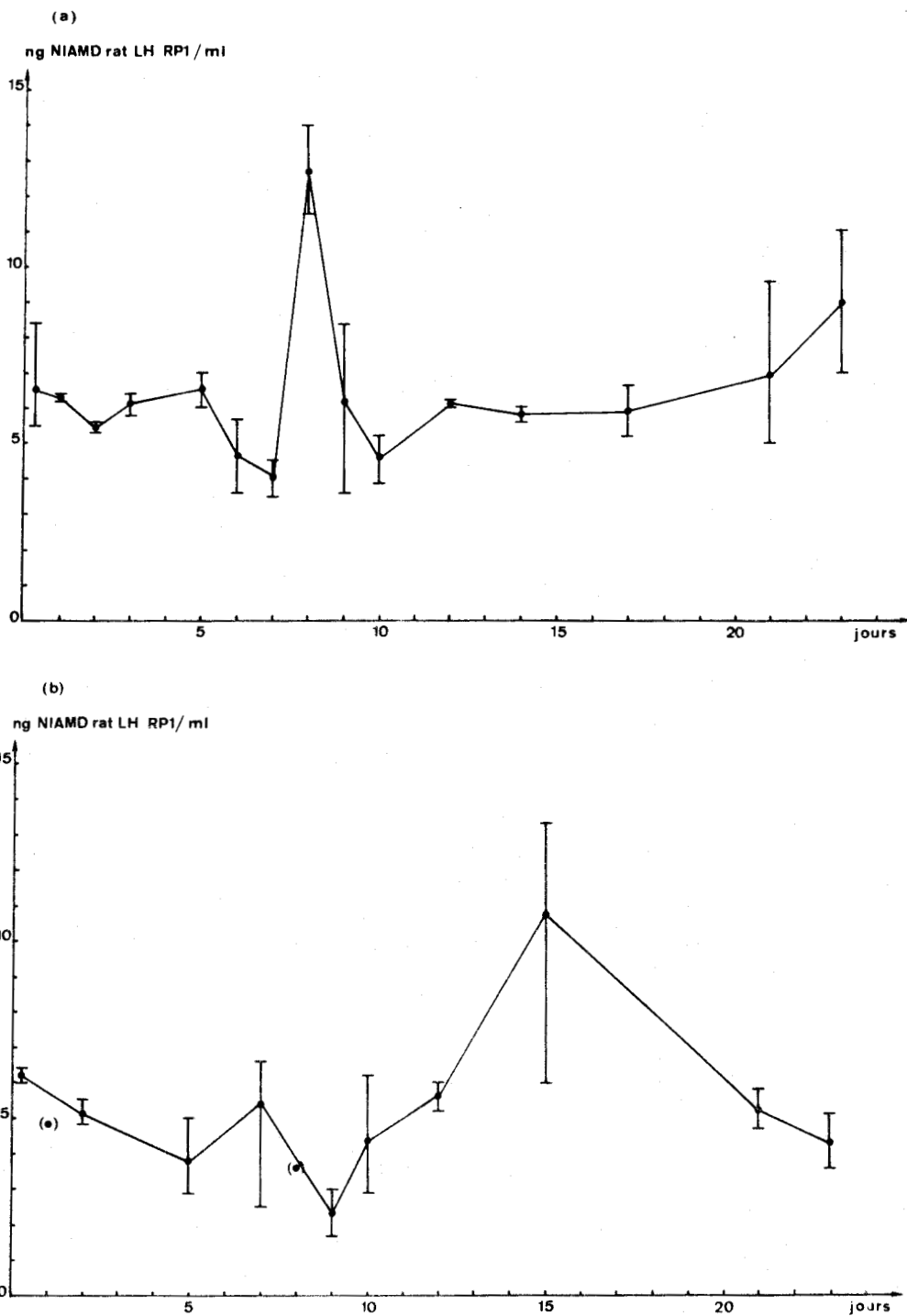


Figure n° 10 : Concentration en LH sérique durant la période post-natale chez les cobayes mâles (a) et femelles (b). Chaque point correspond aux valeurs moyennes pour trois animaux. Les barres verticales représentent l'amplitude. (•) animal isolé.

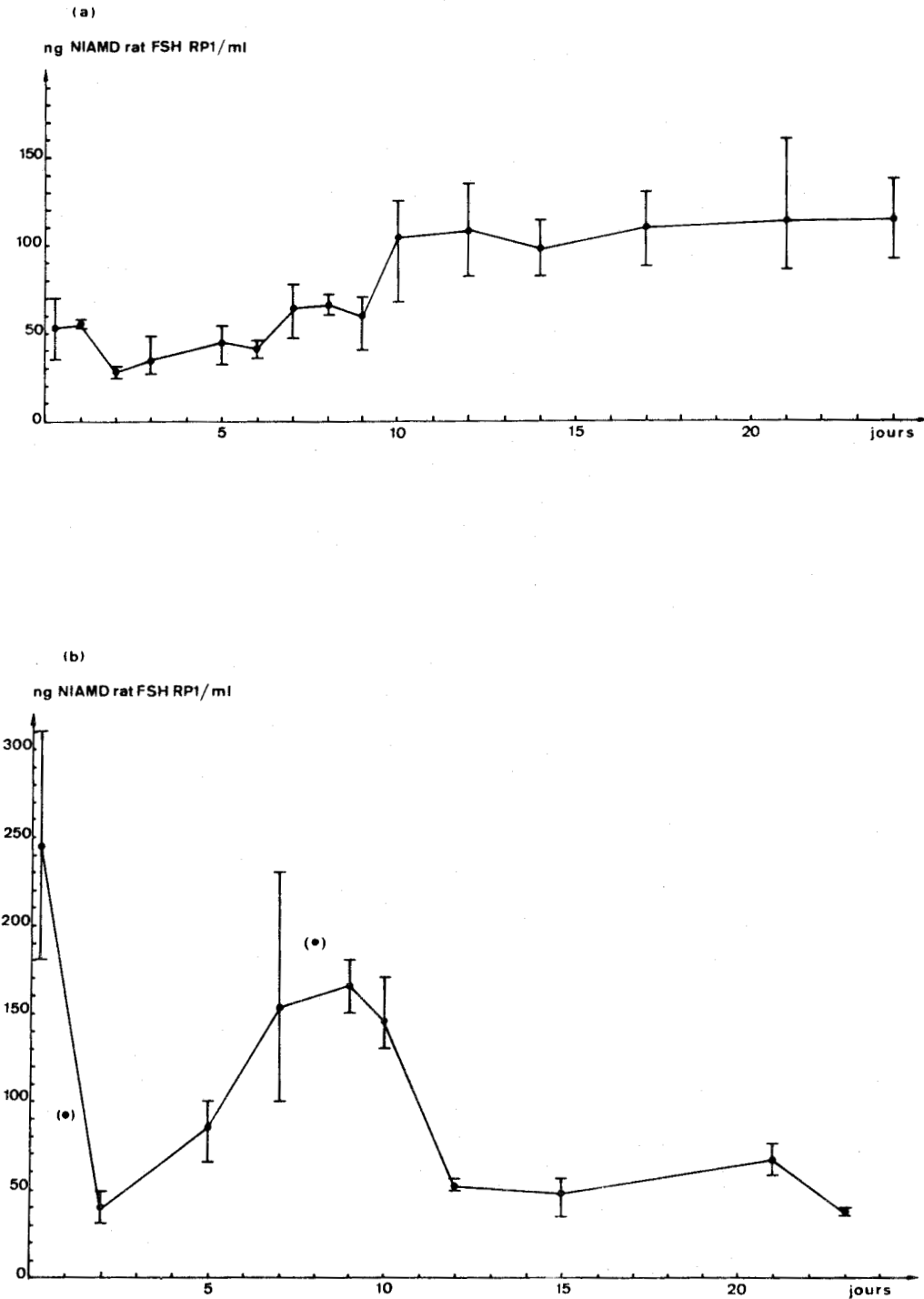
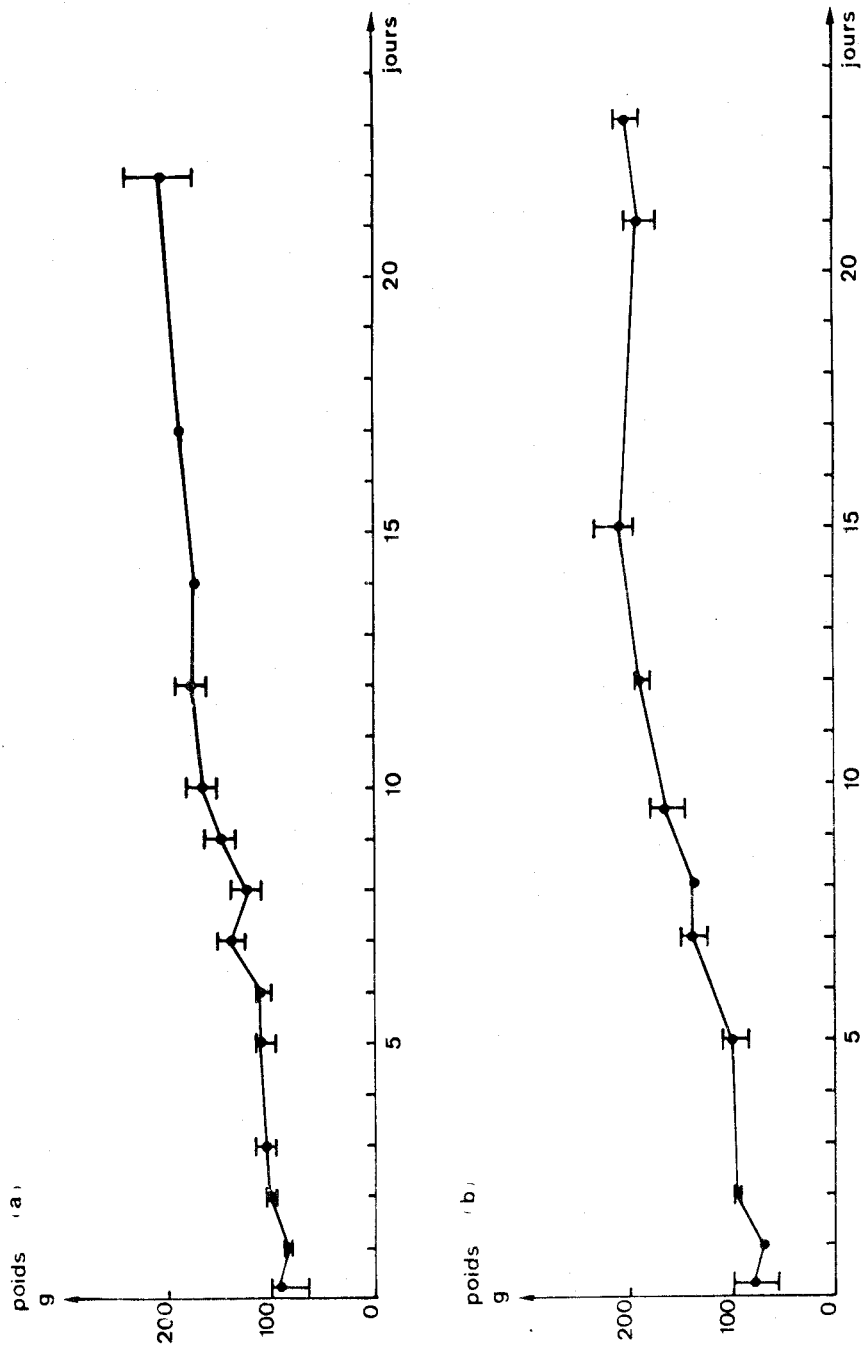


Figure n° 11 : Concentration en FSH sérique durant la période post-natale chez les cobayes mâles (a) et femelles (b). Chaque point correspond aux valeurs moyennes pour trois animaux. Les barres verticales représentent l'amplitude. (•) animal isolé.





**Figure n° 12 :** Augmentation de poids des animaux étudiés,  
en fonction de l'âge  
(a) cobayes mâles - (b) cobayes femelles.  
Les barres verticales représentent l'amplitude.



#### IV - CYCLE OESTRAL

##### A - LH :

Les taux moyens de la LH sérique déterminés pendant la période dioestrals sont équivalents à des taux de NIAMD rat LH RP<sub>1</sub> se situant entre 5 et 7,5 ng/ml. Deux pics de LH ont pu être observés durant le cycle oestral ; le premier a lieu lors de l'oestrus préovulatoire : il s'agit d'une décharge qui atteint une valeur moyenne de 50 ng/ml et qui semble être de très courte durée. Après l'ovulation, pendant la période du post-oestrus I et le début du post-oestrus II, les taux de LH forment un plateau et sont plus élevés que pendant la période du dioestrus. Les valeurs se situent entre 15 et 22,5 ng/ml (Fig. n° 13 p. 67).

##### B - FSH :

Les taux moyens les plus bas de la FSH sérique sont équivalents à 10 à 40 ng/ml de NIAMD rat FSH RP<sub>1</sub> ; ils sont observés à la fin du dioestrus et durant le prooestrus. Un pic très important de FSH débute peu avant l'ovulation et coïncide avec le plateau postovulatoire de LH observé durant le post-oestrus I et le début du post-oestrus II. Ce pic de FSH atteint la valeur moyenne de 280 ng/ml. Au 6ème jour du cycle, les taux de FSH sont à nouveau très bas : 20 ng/ml, puis reprennent des valeurs élevées avec un maximum de l'ordre de 120 ng/ml au 8ème jour (Fig. n° 13 p. 67).

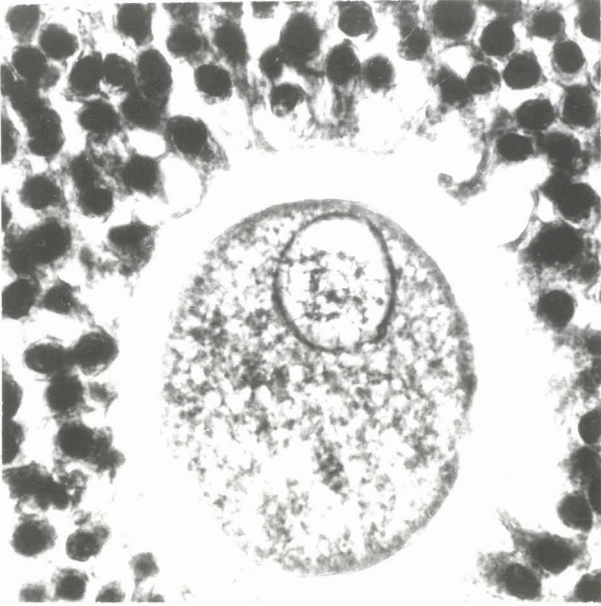
C - Progestérone :

Durant le prooestrus, le taux moyen de la progestérone est de 0,8 à 1,2 ng/ml de sérum. Au cours de l'oestrus il existe un pic de progestérone atteignant des valeurs de 8,7 ng/ml ; ce pic s'observe lors de l'oestrus préovulatoire, peu après la décharge brève et importante de LH. Les coupes d'ovaires montrent alors des follicules de De Graaf dont l'ovocyte est en métaphase de 2<sup>de</sup> division (Planche II). Lors de l'ovulation, le taux de progestérone tombe à 1 ng/ml. Par la suite, on peut observer un second pic de faible importance (2,3 ng/ml) en début de postoestrus I lorsque les taux de LH sont élevés. Enfin, dès le postoestrus II, le taux moyen de progestérone augmente progressivement et atteint un maximum de l'ordre de 7,2 ng/ml au 12<sup>ème</sup> jour du cycle oestral. Par la suite la concentration diminue (Fig. n° 13 p. 67).

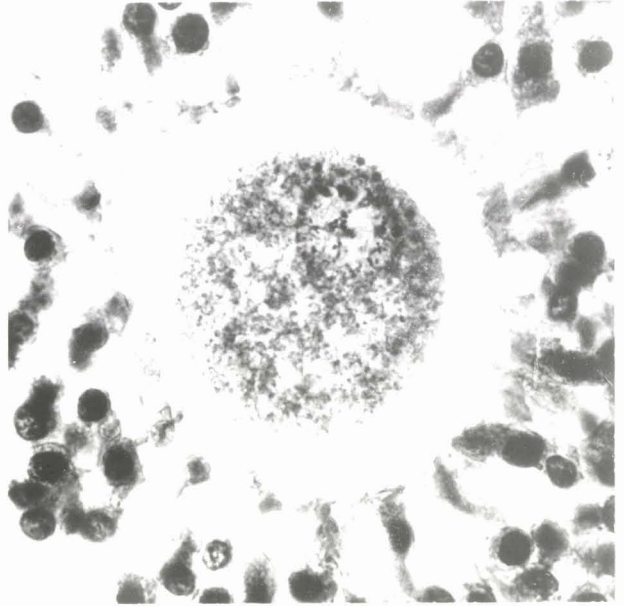
D - Oestradiol :

Le comportement de l'oestradiol au cours du cycle est plus difficile à analyser du fait des variations individuelles importantes qui conduisent à une dispersion des résultats. Il apparaît néanmoins que les taux d'oestradiol sont élevés durant le prooestrus et le début de l'oestrus préovulatoire où ils peuvent atteindre des valeurs de 70 pg/ml. Les valeurs maximales de 17 $\beta$  oestradiol précèdent le pic préovulatoire de LH ; au moment de ce pic, la valeur moyenne d'oestradiol est de 30 pg/ml. Les taux de 17 $\beta$  oestradiol fluctuent de façon non systématique au moment de l'ovulation et de la période de postoestrus. Durant les 10 premiers jours du dioestrus, les valeurs moyennes d'oestrogènes restent inférieures à 30 pg/ml (Fig n° 13 p. 67).

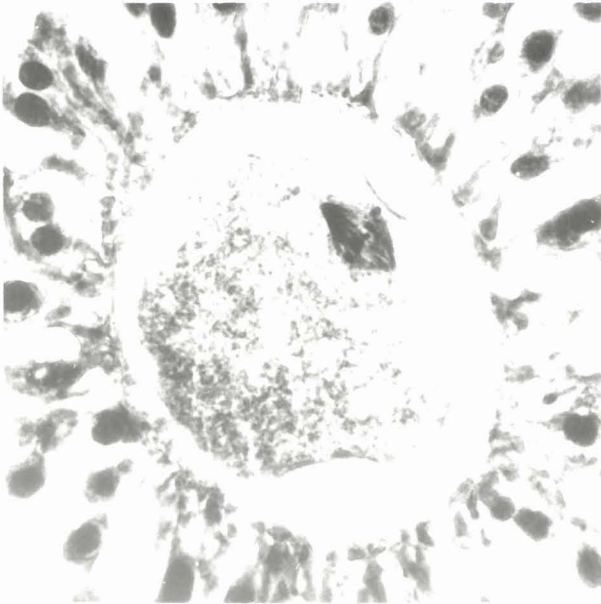
a



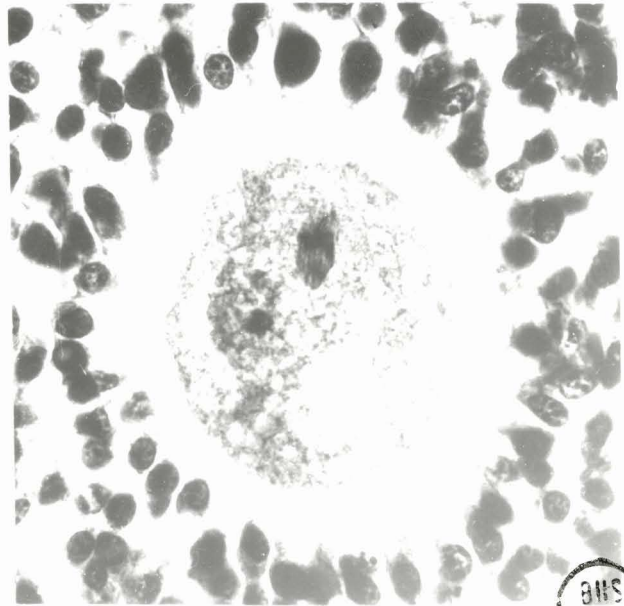
b



c



d



20μ

BMS  
LILLÉ

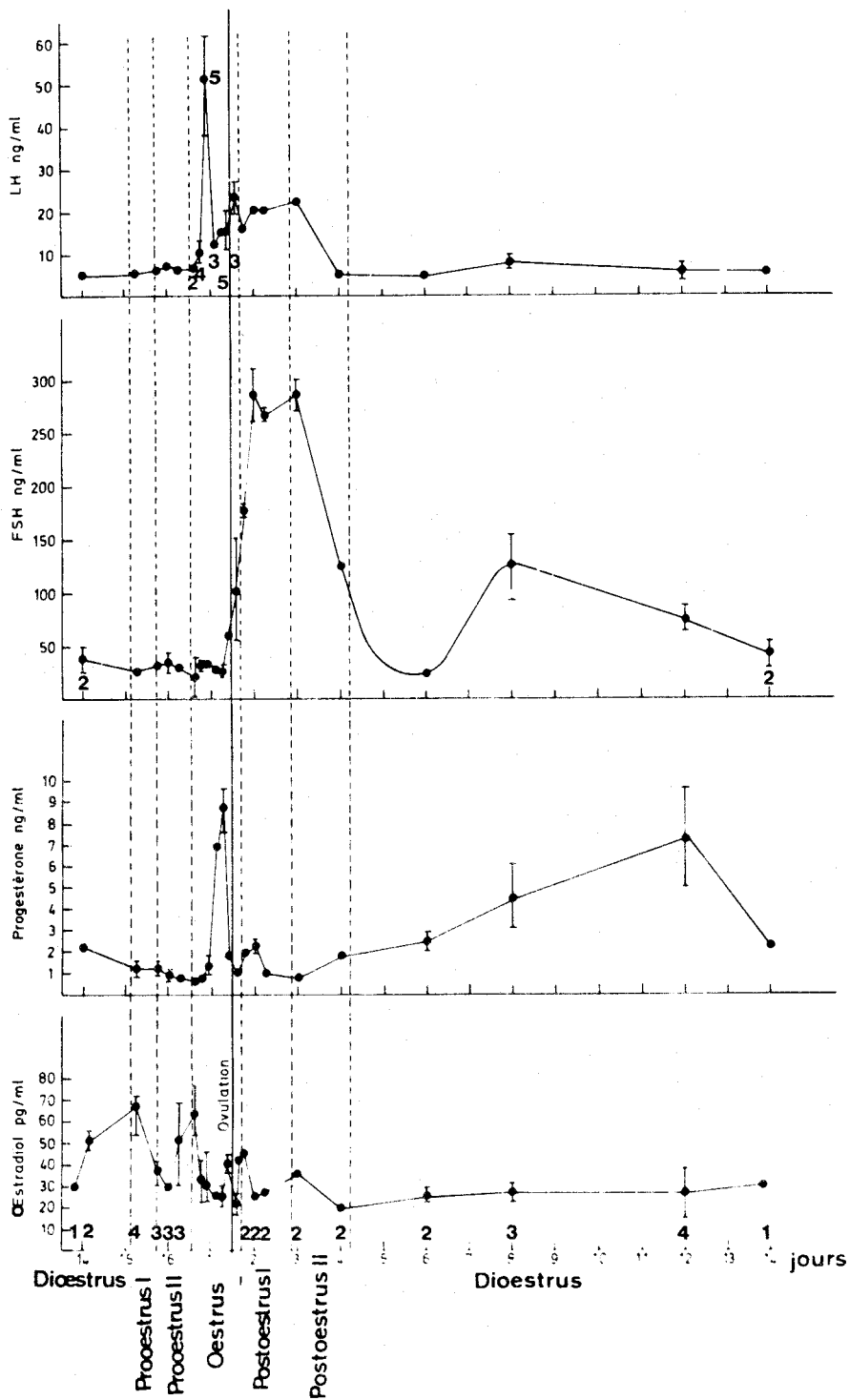


Figure n° 13 : Modifications des taux de LH, de FSH, de progestérone et de  $17\beta$  oestradiol sériques, chez le cobaye, au cours du cycle oestral. Les barres verticales représentent l'amplitude. Le nombre d'animaux sacrifiés pour chaque stade est indiqué.



## V - CASTRATION

### A - LH :

Après castration, les taux de LH sérique n'augmentent de façon significative ( $P \leq 0,05$ ) qu'après un délai de 48 heures ; ils passent alors de 1,65 ng/ml à 5,2 ng/ml (Tableau IV p. 69). Durant les trois premières semaines, ces taux sont très variables : ils oscillent entre des valeurs moyennes de 4 ng/ml à 8 ng/ml les 10 premiers jours et peuvent atteindre, du 12ème au 20ème jour, mais de façon inconstante, des valeurs de l'ordre de 40 ng/ml ; ce n'est qu'à partir du 24ème jour que ces taux se stabilisent entre 30 et 60 ng/ml (Fig. n° 14 p. 70). Après 3 mois de castration, ils semblent avoir tendance à décroître légèrement. Chez les animaux sacrifiés 92 jours après l'opération, les concentrations en LH sérique sont en moyenne 4,7 fois plus importantes que celles des animaux non castrés du même âge, élevés dans les mêmes conditions.

### B - FSH :

L'augmentation des concentrations en FSH sérique, après castration, est hautement significative dès les premières 24 heures après l'opération ( $P = 0,001$ ) (Tableau V p. 71). Les concentrations passent de 90 ng/ml à 226 ng/ml ; un premier maximum de 1100 ng/ml est atteint les 9ème et 10ème jours (Fig. n° 15 p. 72) ; il n'est pas maintenu et l'on observe une baisse très nette les 12ème et 14ème jours (400 ng/ml). Une nouvelle augmentation s'effectue ensuite de façon plus progressive. Des valeurs de l'ordre de 1000 ng/ml sont à nouveau atteintes au 28ème jour.

Tableau IV : LH

		Jours après castration												Témoins Castrés	
Témoins		1	2	4	5	6	8	9	10	12	14	16	18	92	92
		Jours après castration												92	
		21	24	28	35	42	52	62	71	83	92	jours			
$\bar{X}$	1,65	1,7	5,2	12,8	16,5	11,9	14,2	6	16	22,2	6,2	13,5	36	7,2	33,7
n	16	5	10	8	6	14	8	4	8	4	3	3	3	3	5
s	0,8	2	4,7	20	16,5	11	13	5,5	16	22	6,3	4	10,6	0,8	11,5
t	0,085	2,8	2,8	2,22	3,848	3,67	3,87	3,225	3,86	4,1	3,06	11,8	14,4	11	3,3
p	0,9 < p	0,01	0,02-0,05	0,01-0,001	0,01-0,001	0,01-0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,01-0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,01-0,002

$\bar{X}$  : valeurs moyennes (ng NIAMD rat LH RP<sub>1</sub>/ml sérums)

n : nombre d'animaux

s : écart-type

t : valeur de t

p : probabilité



Figure n° 14 : Effet de la castration sur les taux sériques de LH chez le cobaye mâle.

Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (P = 0,05). Le nombre d'animaux par point de courbe est indiqué.

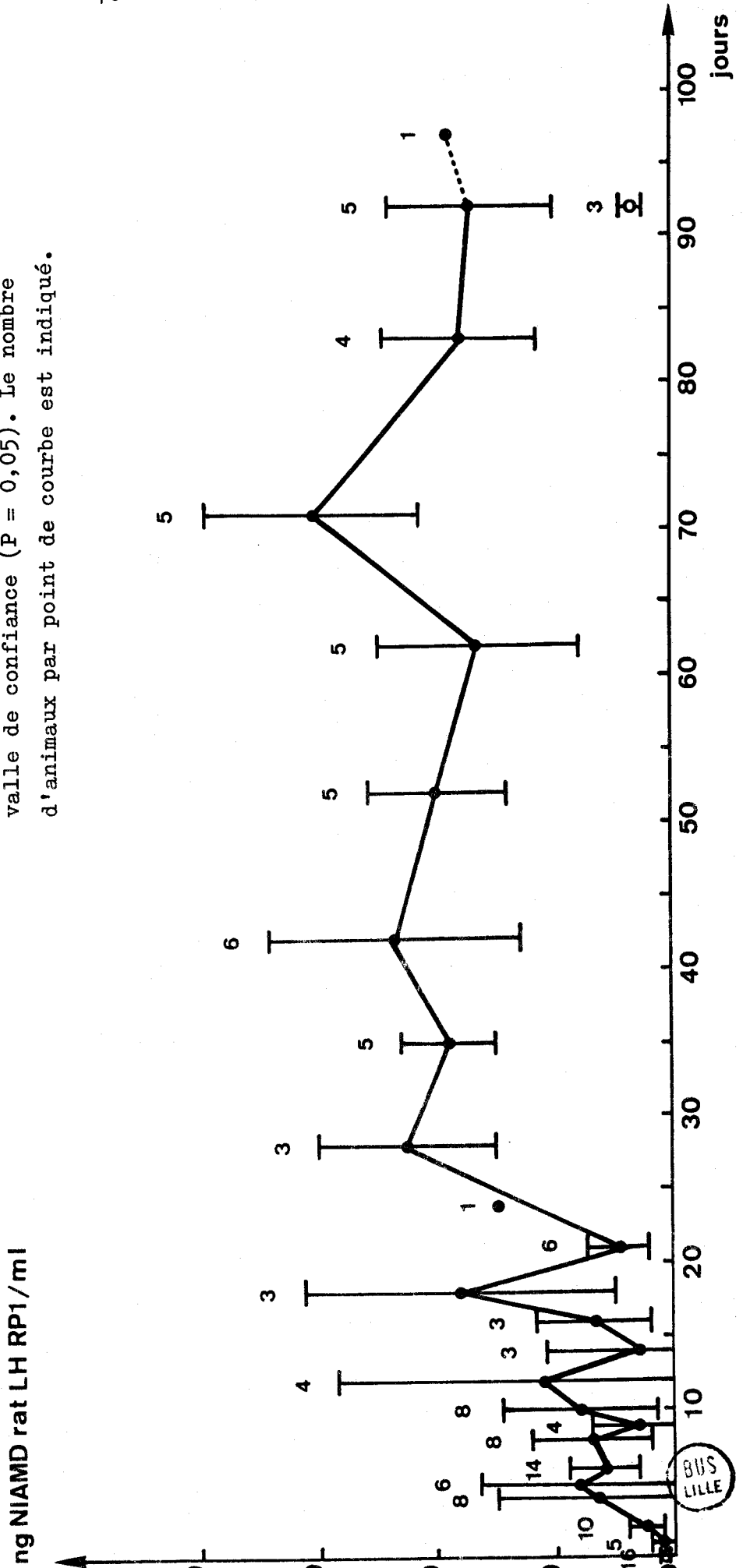


Tableau V : FSH

		Jours après castration																			
Témoins		1	2	4	5	6	8	9	10	12	14	16	18	Témoins						Castrés	
		Jours après castration												Jours après castration						92 jours	
$\bar{X}$	90	226	480	530	790	725	940	1070	1090	660	406	626	540	92	92	92	92	92	92	92	
n	15	5	10	8	6	13	8	4	8	4	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	
s	19	40,7	129	125	189	339	373	391	455	139	98,5	70	49	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
t		9,93	11,7	13,2	14	6,98	8,5	9,8	8,5	16,5	12,6	26,8	27,9	1,722	1,722	1,722	1,722	1,722	1,722	1,722	
p		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	

$\bar{X}$  : valeurs moyennes (ng NIAMD rat FSH RP<sub>1</sub>/ml sérums)

n : nombre d'animaux

s : écart-type

t : valeur de t

p : probabilité

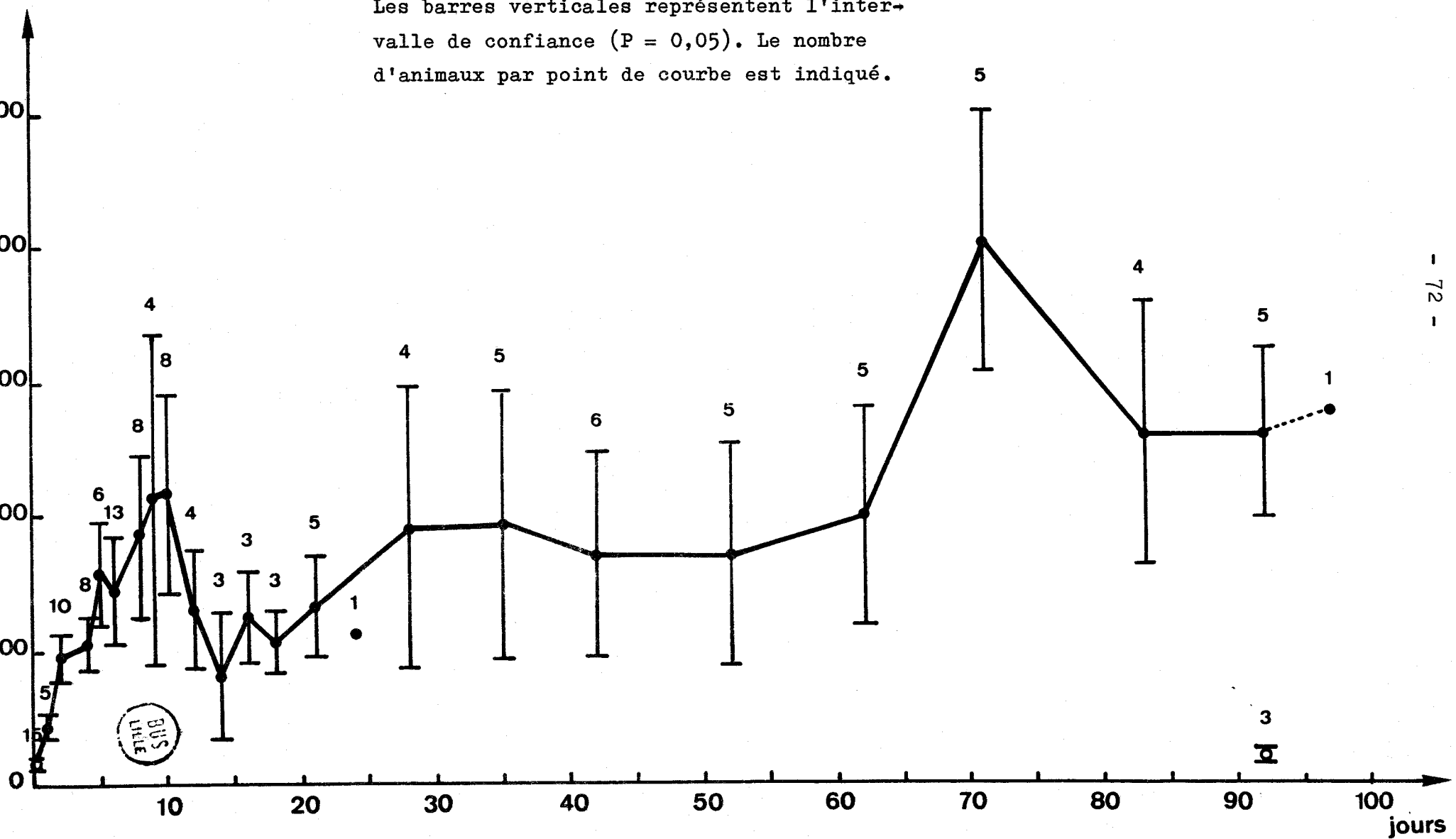


Figure n° 15 : Effet de la castration sur les taux sériques

ng NIAMD rat FSHRP1/ml

de FSH chez le cobaye mâle.

Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (P = 0,05). Le nombre d'animaux par point de courbe est indiqué.

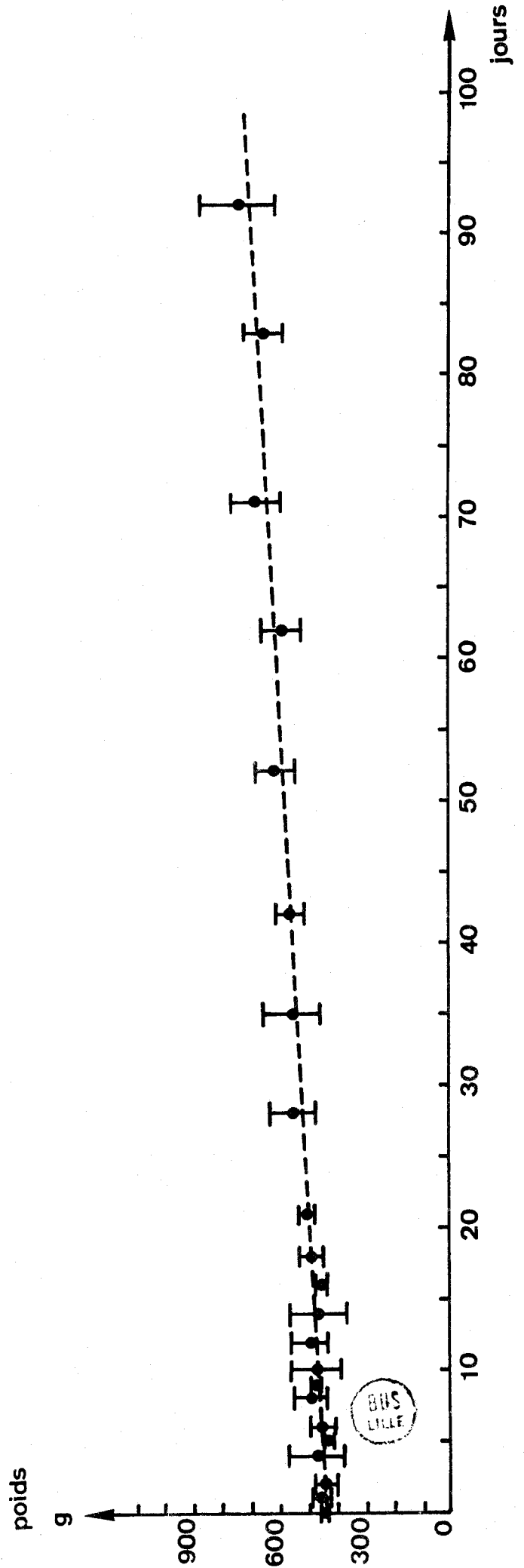


Les taux se stabilisent alors ; il faut observer cependant un accroissement très progressif pour atteindre 1300 ng/ml 3 mois après castration.

Nous notons des taux particulièrement élevés en FSH (2000 ng/ml) pour le lot de cobayes sacrifiés 71 jours après castration (mais ces mêmes animaux ayant également des valeurs très élevées en LH (60 ng/ml), ils auraient peut-être montré dans l'ensemble des valeurs plus élevées de gonadotrophines que les autres groupes, quel que soit le jour du sacrifice).

La prise de poids des animaux après la castration est régulière et linéaire (Fig. n° 16 p. 74); ces animaux semblent donc avoir supporté correctement l'opération.

Figure n° 16 : Augmentation du poids des animaux castrés étudiés.  
Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance (P = 0,05).



## VI - INJECTION DE LRF

L'injection intrapéritonéale de LRF synthétique chez le cobaye mâle provoque une augmentation très importante des taux de LH sérique ; un maximum est atteint 1h30 après l'injection, les valeurs sont alors multipliées par 8. Les taux de testostérone sérique augmentent simultanément mais ne décroissent que plus lentement.

1h30 après l'injection, on observe également une augmentation des taux de FSH sérique montrant l'ambiguïté de l'action du LRF. Cette augmentation est cependant beaucoup plus faible que celle de LH : en effet, les taux n'atteignent que le double de la valeur initiale avant injection (Fig. n° 17 p. 76).



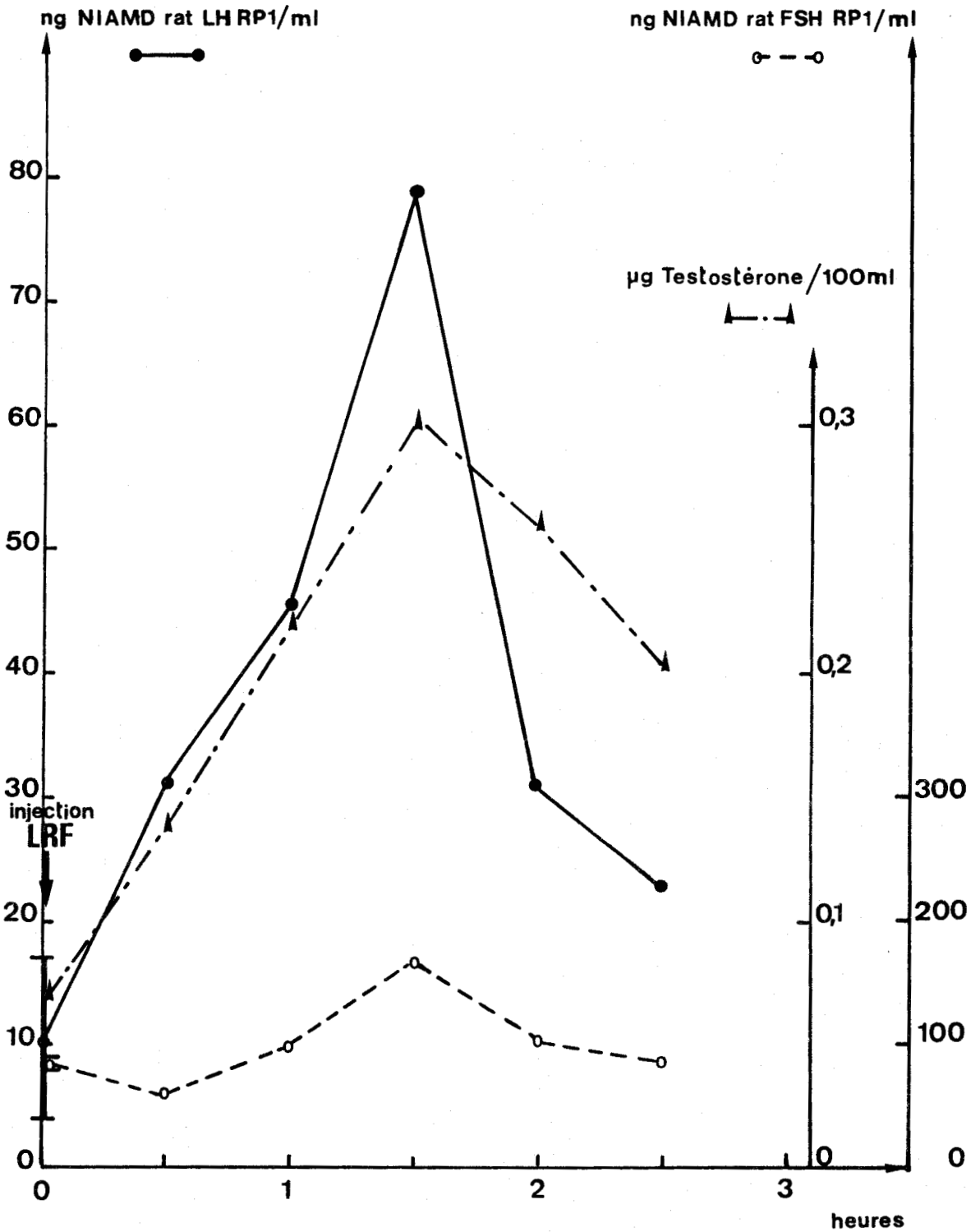


Figure n° 17 : Effet de l'injection intrapéritonéale de LRF synthétique sur les taux sériques de LH, de FSH et de testostérone chez le cobaye mâle.



D I S C U S S I O N

---oo0oo---

Dans les systèmes hétérologues de dosages radio-immunologiques des gonadotrophines, seuls les sites non spécifiques de l'espèce sont concernés ; en outre, leur affinité pour une molécule antigénique de structure tertiaire, différente de celle contre laquelle ils ont été fabriqués, est souvent plus faible (ce qui se traduit par une pente moins accusée des courbes) ; mais ceci permet de les appliquer avec succès à différentes espèces animales.

Ce fait est d'un grand intérêt, notamment en ce qui concerne les dosages chez le cobaye, animal pour qui nous ne pouvons utiliser un système homologue en raison des trop faibles quantités d'hormones hypophysaires qui ne permettent pas l'obtention de fractions suffisamment purifiées pour fabriquer des anticorps dirigés spécifiquement contre la FSH ou la LH de cobaye ; aussi, même en se plaçant dans les meilleures conditions possibles, c'est-à-dire en prenant les adénohypophysés de cobayes de 10-30 jours, la quantité de matériel de départ reste faible ; en effet, les antéhypophysés de cobayes femelles âgés de 34 jours contiennent, pour un poids de 5,89 mg, une activité biologique, mesurée par la méthode de STEELMAN et POHLEY, de 53  $\mu$ g de NIH FSH SI, soit, proportionnellement au poids de la glande, une quantité 20 fois moins importante que chez la rate âgée de 22 jours (poids de l'antéhypophyse : 1,42 ng - 276  $\mu$ g NIH FSH SI) (BROWN 1971 (70)).

Nous avons utilisé des méthodes d'extractions non dénaturantes mais qui provoquent des pertes de matériel très importantes lors des différentes précipitations et chromatographies ; celles-ci limitent alors la purification des fractions.

Alors que REICHERT 1971 (114), par électrofocalisation des gonadotrophines humaines avait toujours trouvé une activité LH associée à la fraction FSH, récemment KERCRET et DUVAL 1975 (94) sont parvenus à isoler, à partir d'adrénohypophyses de rat, une fraction d'activité immunologique FSH dépourvue d'activité LH.

Le pic de FSH qui se situe aux environs de pH 3,3 en gradient 3-6 et de pH 2,8 en gradient 2,5-4 est cependant assez large ; cette hétérogénéité pourrait être due à une désialysation partielle de certaines molécules.

Cette méthode, qui ne nécessite qu'un petit nombre de glandes chez le rat (rendement de 41 p. 100), pourrait peut-être être essayée avec succès chez le cobaye.

Toutefois, elle n'a pas donné de résultats satisfaisants pour la LH : en effet, celle-ci apparaît très hétérogène et focalise aux environs de pH 9, mais des préparations de LH hautement purifiées présentent également un pic important en zone acide. Le rendement est de 6,5 p.100.

Le sérum de lapin anti FSH ovine utilisé permet le dosage des FSH de différents mammifères : rat (HENDRICK et coll. 1971 (75)), lapin (DUFY-BARBE et coll. 1972 (77)), boeuf (DERIVAUX et coll. 1974 (95)), cobaye (CROIX et FRANCHIMONT 1975 (96)), mais aussi celles d'oiseaux : canard (CROIX et coll. 1974 (91)).

Les gonadotrophines sont composées de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les sous-unités  $\alpha$  auraient une structure très voisine pour la FSH, la LH et la TSH mais seraient spécifiques de l'espèce ; les sous-unités  $\beta$  seraient, elles, responsables de l'activité biologique donc caractéristiques du type d'hormone mais présenteraient une spécificité moins grande d'une espèce à l'autre (PIERCE et coll. 1971 (97, 98)).

Les expériences biologiques montrent bien qu'il n'existe pratiquement pas de spécificité d'espèce pour les sites biologiques. En effet il est possible de doser l'activité biologique de la FSH d'oiseau sur des rats par la méthode de STEELMAN et POHLEY (FOLLET et coll. 1972 (99)).

Lors de nos dosages de FSH, l'anticorps utilisé réagit donc probablement contre des sites antigéniques porteurs de l'activité biologique de la sous-unité  $\beta$ , ce qui expliquerait la réaction croisée complète que nous pouvons obtenir entre deux espèces zoologiques aussi éloignées.

Néanmoins la FSH humaine native inhibant la réaction entre la FSH marquée de rat et les anticorps anti FSH ovine et la  $\beta$ FSH étant incapable de produire seule le même effet, l'association des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  serait nécessaire pour que l'anticorps puisse se fixer sur ces sites.

Ceci est en accord avec les résultats trouvés lors des dosages biologiques effectués sur les sous-unités séparées (DE LA LLOSA 1972 (100)) et confirme que l'association des deux sous-unités confère une structure tertiaire particulière à la molécule, indispensable à l'expression biologique et immunologique.

Les résultats des dosages radio-immunologiques des gonadotrophines sériques que nous avons obtenus chez le cobaye durant la période post-natale (CROIX 1976 (115)) sont à rapprocher de ceux décrits par DONOVAN et coll. 1975 (101, 102). Nous notons toutefois quelques différences : en effet, pour ce qui concerne la FSH, le système de dosage que nous utilisons nous donne des valeurs deux à trois fois plus basses d'une part, d'autre part, nous n'avons pas noté d'augmentation en FSH accompagnant le léger accroissement que l'on observe en LH chez les mâles âgés de 2 à 5 jours ; cependant les courbes sont dans leur ensemble comparables, notamment en ce qui concerne :

- le pic très net de LH sérique observé chez les jeunes mâles de 8-9 jours, lorsque les taux de FSH sont alors relativement peu élevés. Une mise en charge importante en matériel spécifiquement immunoréactif avec des antisérums anti LRF de synthèse se produit, ces mêmes jours, au niveau de l'infundibulum (BARRY et DUBOIS 1974 (45)).

- les taux importants de FSH chez les femelles durant les premières heures qui suivent la naissance, rappelant ceux particulièrement élevés des foetus femelles après 65 à 68 jours de gestation (DONOVAN et coll. 1975 (102)).
- l'augmentation également de la concentration en FSH sérique chez les femelles en début de seconde semaine post-natale, précédant la période de croissance pondérale rapide de l'ovaire.

Ces méthodes de dosage de la FSH et de la LH, de même que celles permettant d'apprécier les oestrogènes et la progestérone sériques ont également permis de définir les variations cycliques de ces hormones et leur séquence au cours du cycle oestral du cobaye (CROIX et FRANCHIMONT 1975 (96)).

Il existe un pic de LH sérique durant l'oestrus, peu de temps avant l'ovulation. Par la suite, la LH diminue, puis augmente et se maintient en plateau à des valeurs élevées pendant la période du post-oestrus.

Ces variations sériques de LH sont en accord avec les observations effectuées par BARRY et DUBOIS 1974 (47) sur les variations de charge, dans l'éminence médiane, en matériel spécifiquement immunoréactif avec des antisérums anti LRF de synthèse.

L'évolution des taux de FSH sérique ne coïncide pas systématiquement avec celle de la LH. En effet, il n'y a pas de pic préovulatoire de FSH.

Par contre en période de postoeustrus I, les taux de FSH et de LH sont accrus.

Une dissociation des taux de FSH et de LH au cours de l'induction de l'ovulation par le coït a également été mise en évidence chez le lapin (DUFY-BARBE et coll. 1973 (103)).

Ces observations renforcent la notion d'une régulation spécifique et indépendante de la sécrétion de la FSH et de la LH.

Comme dans l'espèce humaine (FRANCHIMONT 1972 (104)) le taux des oestrogènes s'accroît durant la période préovulatoire (prooestrus et début d'oestrus) pour atteindre leur maximum peu de temps avant le pic préovulatoire de la LH, tandis que la progestérone ne présente un accroissement que peu après ce dernier. L'accroissement de la progestérone pendant le postoestrus II et le dioestrus succède au plateau de LH en postoestrus I et au début du postoestrus II.

Des dosages de progestérone et d'oestradiol pendant le cycle oestral du cobaye ont également été effectués par JOSHI et coll. 1973 (105) ; ces auteurs n'ont cependant pas suivi les valeurs jour par jour mais ont sélectionné 4 périodes du cycle. Les valeurs que nous donnons sont plus faibles que celles trouvées par ces auteurs qui effectuaient les dosages à partir du sérum prélevé au niveau de la veine ovarienne. Nos valeurs sont en accord avec celles trouvées antérieurement par FEDER et coll. 1968 (106) dans le sang circulant.

En ce qui concerne le dosage d'oestradiol, nous avons observé, comme CHALLIS et coll. 1971 (107), que les taux sont faibles chez le cobaye et qu'il existe de grandes variations individuelles de ces taux à un même moment du cycle oestral.

Comme chez le rat, et à la différence des résultats observés chez le lapin, pour qui les stéroïdes surrénaliens pourraient en partie compenser la suppression des stéroïdes gonadiques et parvenir à maintenir la rétroaction négative exercée sur la sécrétion de LH (DUFY-BARBE et coll. 1972 (108)), la castration, chez le cobaye mâle adulte, affecte tant les concentrations sériques de LH que celles de FSH (CROIX (116)).

Cependant, alors que les concentrations en LH sérique n'augmentent qu'après une latence de 48 heures et par oscillations d'amplitudes progressivement croissantes, ce qui correspond assez bien à la mise en

charge en LRF des cellules hypothalamiques observées en immunofluorescence par BARRY et coll. 1974 (42), les concentrations en FSH augmentent beaucoup plus rapidement et à des taux d'emblée très élevés.

Les mécanismes régulant les sécrétions de LH et de FSH au niveau hypothalamo-hypophysaire semblent donc s'exercer de façon très différente.

L'augmentation des taux de LH peut s'expliquer par la disparition de la rétroaction négative exercée par la testostérone et ses métabolites (androstène-dione et dihydrotestostérone) sur la sécrétion de LH.

A la différence de ce qui se produit pour les oestrogènes, ce contrôle semble s'exercer au niveau de l'hypothalamus et non de la pré-hypophyse : en effet, il ne diminue pas les sécrétions de LH et de FSH obtenues en réponse à une injection de LRF (VON ZUR MUHLEN et KOBBERLING 1973 (109), FRANCHIMONT et coll. 1975 (110)).

A des doses peu élevées, la testostérone n'a pas d'effets sur la sécrétion de FSH (DUFY-BARBE et FRANCHIMONT 1972 (111)).

Cette sécrétion peut cependant être inhibée par injection intrapéritonéale d'une substance de nature protéinique contenue dans le plasma séminal ; cette inhibition s'exerce sélectivement sur la sécrétion de FSH (FRANCHIMONT et coll. 1975 (110)) ; cette substance serait issue de l'épithélium germinale des testicules et jouerait le rôle d'un inducteur spermatogénétique. Lors de la castration, la suppression de cette rétroaction négative pourrait être la cause de l'augmentation de la sécrétion de FSH.

A l'heure actuelle, le problème de l'existence d'une seule ou de deux "releasing" hormones hypothalamiques différentes, responsables des sécrétions hypophysaires de LH et de FSH est posé.



Les dissociations très nettes des taux sériques de LH et de FSH que nous observons chez le cobaye, au cours du cycle oestral, de la période post-natale et de la castration seraient en faveur d'une dualité des contrôles hypothalamiques.

En effet, les variations sériques de LH coïncident, dans les différents états physiologiques et expérimentaux étudiés, avec les variations de charge en matériel spécifiquement immunoréactif avec des antisérums anti LRF de synthèse observées par BARRY au niveau de l'émittance médiane.

En outre, nous notons des taux sériques élevés de FSH chez les jeunes cobayes femelles de 140-170 g, correspondant aux périodes de mises en charge particulièrement importantes des cellules neurosécrétrices à grains acidophiles du noyau hypothalamique latérodorsal interstitiel (BARRY 1972 (112)) ; ces cellules pourraient donc intervenir plus spécifiquement dans le contrôle de la sécrétion préhypophysaire de FSH. Cette hypothèse pourrait faire l'objet de vérifications directes "in vitro" en cultures de préhypophyses.

C O N C L U S I O N

---oo0oo---

- A partir d'antéhypophyses de cobayes âgés de 10-30 jours (âge pour lequel les taux de gonadotrophines pituitaires sont élevés), des extraits FSH et LH de cobaye ont été préparés, dans les conditions les moins dénaturantes possibles, par des fractionnements au sulfate d'ammonium et des chromatographies sur CM cellulose et DEAE cellulose.
- Nous avons ainsi isolé des fractions d'activité FSH 30 fois supérieure à celle de l'extrait non purifié ainsi que des fractions enrichies de 40 à 50 fois en activité LH.
- Par ces techniques, les pertes de matériel sont cependant importantes et nécessiteraient le sacrifice d'un nombre très élevé de cobayes - qu'il nous était impossible d'obtenir - pour permettre l'isolement de fractions FSH et LH dépourvues d'activités contaminantes et être ainsi utilisables pour la préparation d'immasérums spécifiques anti FSH ou anti LH de cobaye.
- Les fractions que nous avons isolées nous ont permis de mettre en évidence une réaction croisée complète et spécifique entre la FSH et la LH hypophysaires de cobaye et l'hormone correspondante de rat, dans des systèmes hétérologues de dosages radio-immunologiques comprenant une hormone marquée FSH ou LH de rat et des antisérums anti FSH ou LH ovines.
- Ces dosages radio-immunologiques des gonadotrophines ont été effectués, soit par la technique de double précipitation, soit par celle

d'immunoabsorption ; leur sensibilité est de l'ordre de 0,95 ng pour le dosage de FSH et de 0,22 ng pour celui de LH. Ils ont pu être adaptés pour le dosage de ces hormones dans les sérums des cobayes.

- Lors de différents états biologiques (période post-natale - cycle oestral - castration), il apparaît une dissociation des taux sériques de LH et de FSH.

Cette dissociation est particulièrement marquée au cours du cycle oestral et lors de la castration :

- la décharge brève et importante préovulatoire de LH précède nettement l'augmentation des taux de FSH qui ne s'effectue qu'au moment de l'ovulation.

L'examen histologique des coupes sériées des ovaires et du vagin des animaux a permis de déterminer avec exactitude le moment du cycle.

- chez les cobayes mâles castrés, les concentrations sériques en FSH s'élèvent rapidement de façon hautement significative alors que celles en LH n'augmentent qu'après un délai de 48 heures et d'une façon beaucoup plus modérée.

- Ces résultats suggèrent une double commande des sécrétions préhypophysaires de LH et de FSH chez le cobaye. Celle-ci pourrait s'exercer soit au niveau de l'activité hypothalamique, soit au niveau des cellules de la préhypophyse qui secrèteraient préférentiellement l'une ou l'autre des deux gonadotrophines selon une sensibilisation fonction de l'équilibre oestro-progestéronique.

- Par ailleurs les dosages des stéroïdes gonadiques au cours du cycle oestral du cobaye ont montré :

- une sécrétion notable et prolongée d'oestradiol avant le pic préovulatoire de LH ; ceci est en accord avec les observations effectuées chez d'autres espèces pour lesquelles il

a été établi que la décharge cyclique de LH dépendait de la rétroaction positive de l'hypothalamus aux oestrogènes.

- une sécrétion progestéronique ne débutant qu'après le pic de LH, ce qui est également rencontré chez les autres espèces animales.

B I B L I O G R A P H I E

---oo0oo---

	Réf.	Pages
- ABRAHAM G.E., SWERDLOFF R., TULCHINSKY D. and ODELL W.D. Radioimmunoassay of plasma progesterone. J. Clin. Endocr. Metab. 32 : 619-624 (1971)	(83)	32
- ARIMURA A., SATO H., KUMASAKA T., WOROBEK R.B., DEBELJUK L., DUNN J. and SCHALLY A.V. Production of Antiserum to LH-Releasing Hormone (LH-RH) Associated with Gonadal Atrophy in Rabbits : Development of Radioimmunoassay for LH-RH. Endocrinology <u>93</u> : 1092-1103 (1973)	(40)	6
- BARRACLOUGH C.A. and GORSKI R.A. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen induced sterility in the female rat. Endocrinology <u>68</u> : 68-79 (1961)	(7)	2-5
- BARRY J. Etude des modifications du noyau hypothalamique latéro-dorsal interstitiel chez le cobaye albinos femelle au cours de la phase de croissance pré-pubertaire de l'ovaire. C.R. Soc. Biol. <u>166</u> : 1720-1723 (1972)	(112)	84
- BARRY J., DUBOIS M.P. and POULAIN P. LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. Z. Zellforsch. <u>146</u> : 351-366 (1973)	(41)	6

- |   | Ref. | Pages |
|---|------|-------|
| - BARRY J. et DUBOIS M.P.<br>Etude en immunofluorescence des structures hypothalamiques à compétence gonadotrope.<br>Ann. Endocr. <u>34</u> : 735-742 (1973)  | (44) | 7     |
| - BARRY J. et DUBOIS M.P.<br>La voie préoptico-infundibulaire à LH-RH chez le cobaye au cours de la gestation.<br>C. R. Soc. Biol. <u>167</u> : 1812-1815 (1973)  | (46) | 7     |
| - BARRY J., DUBOIS M.P. and CARETTE B.<br>Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway in normal, castrated and testosterone-treated male guinea-pig.<br>Endocrinology <u>95</u> : 1416-1423 (1974)                                      | (42) | 7-83  |
| - BARRY J. et DUBOIS M.P.<br>Etude en immunofluorescence de la différenciation prénatale des cellules hypothalamiques élaboratrices de LH RF et de la maturation de la voie neurosécrétrice préoptico-infundibulaire chez le cobaye.<br>Brain Res. <u>67</u> : 103-113 (1974) | (45) | 7-80  |
| - BARRY J. and DUBOIS M.P.<br>Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway of the guinea-pig during the oestrus cycle.<br>Neuroendocrinology <u>15</u> : 200-208 (1974)  | (47) | 7-81  |
| - BARRY J. and CARETTE B.<br>Immunofluorescence study of LRF Neurons in Primates.<br>Cell. Tiss. Res. <u>164</u> : 163-178 (1975)   | (51) | 7     |



	Réf.	Pages
- BLAKE C.A., NORMAN R.L. and SAWYER C.H. Localization of inhibitory actions of estrogen and nicotine on release of luteinizing hormone in rats. Neuroendocrinology <u>16</u> : 22-42 (1974)	(22)	5
- BROWN P.S. Pituitary follicle stimulating hormone in immature guinea pigs and hamsters and in female rats after neonatal treatment with testosterone. J. Reprod. Fert. <u>27</u> : 187-192 (1971)	(70)	11-78
- BUTT W.R., CROOKE A.G. and CUNNINGHAM F.J. The use of ion-exchange materials in the fractio- nation of gonadotrophins from urine. Acta Endocr. Copenh. <u>32</u> : 509-518 (1959)	(66)	11
- BUTT W.R. and LYNCH S.S. Human pituitary FSH. Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophy- saires. 82-91 (1972)	(59)	10
- BUTT W.R., CROOKE A.C. and CUNNINGHAM F.J. Studies on human urinary and pituitary gonadotro- phins. Biochem. J. <u>81</u> : 596-605 (1961)	(67)	11-13
- CAHILL C.L., SHETLAR M.R., PAYNE R.W., ENDECOTT B. and LI Y.T. Isolation and characterization of ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta <u>154</u> : 40-52 (1968)	(55)	10
- CAHILL C.L. and HART K.M. Sedimentation velocity and equilibrium characteris- tics of ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta <u>194</u> : 227-233 (1969)	(53)	10

- |   | Réf.  | Pages |
|---|-------|-------|
| - CHALLIS J.R.G., HEAP R.B. and ILLINGWORTH D.V.<br>Concentrations of oestrogens and progesterone in<br>the plasma of non pregnant and lactating guinea<br>pigs.<br>J. Endocr. <u>51</u> : 333-345 (1971)   | (107) | 82    |
| - CROIX D., HENDRICK J.C., BALTHAZART J. et<br>FRANCHIMONT P.<br>Dosage radio-immunologique de l'hormone folliculo-<br>stimulante (FSH) hypophysaire de canard à l'aide<br>d'un système de mammifères.<br>C.R. Soc. Biol. <u>168</u> : 136-140 (1974)     | (91)  | 46-79 |
| - CROIX D. and FRANCHIMONT P.<br>Changes in the Serum Levels of the Gonadotrophins,<br>Progesterone and Estradiol during the Estrus Cycle<br>of the Guinea-pig.<br>Neuroendocrinology <u>19</u> : 1-11 (1975)   | (96)  | 79-81 |
| - CROIX D.<br>Variations des taux sériques de LH et de FSH durant<br>la période post-natale chez le cobaye.<br>C.R. Acad. Sci. (1976) (à paraître)  | (115) | 80    |
| - CROIX D.<br>Publication en préparation.   | (116) | 82    |
| - DEBELJUK L., ARIMURA A. and SCHALLY A.V.<br>Effect of estradiol and progesterone on the LH<br>release induced by LH-releasing hormone (LH-RH)<br>in intact diestrous rats and anestrous ewes.<br>Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>139</u> : 774-777 (1972) | (23)  | 5     |
| - DE LA LLOSA P., COURTE C. and JUTISZ M.<br>On the mechanism of reversible inactivation of lutei-<br>nizing hormone by urea.<br>Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>26</u> : 411-416 (1967)  | (62)  | 10    |

- |   | Réf.  | Pages |
|---|-------|-------|
| - DE LA LLOSA P. and JUTISZ M.<br>Reversible dissociation into sub units and biological activity of ovine luteinizing hormone.<br>Biochim. Biophys. Acta <u>181</u> : 426 (1969)  | (63)  | 10    |
| - DE LA LLOSA P.<br>Gonadotrophines hypophysaires animales, LH et FSH : structure chimique et relation structure primaire, activité biologique.<br>Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophysaires : 93-116 (1972)                    | (100) | 80    |
| - DEN HOLLANDER F.C. and SCHUURS A.H.W.M.<br>Radioimmunoassay methods . Discussion ; in KIRKHAM and HUNTER p. 419 (Churchill Livingstone ; London) (1971)   | (80)  | 28    |
| - DERIVAUX J., ECTORS F., HENDRICK J.C. et FRANCHIMONT P.<br>Détermination de la FSH plasmatique chez les bovins.<br>Ann. Endocr. <u>35</u> : 614-621 (1975)  | (95)  | 79    |
| - DONOVAN B.T., Ter HAAR M.B., LOCKHART A.N., Mac KINNON P.C.B., MATTOCK J.M. and PEDDIE M.J.<br>Changes in the concentration of luteinizing hormone in plasma during development in the guinea-pig.<br>J. Endocr. <u>64</u> : 511-520 (1975) | (101) | 80    |
| - DONOVAN B.T., Ter HAAR M.B., LOCKHART A.N. and PEDDIE M.J.<br>Changes in the concentration of follicle stimulating hormone in plasma during development in the guinea-pig.<br>J. Endocr. <u>64</u> : 521-528 (1975)                         | (102) | 80    |

	Réf.	Pages
- DUFY-BARBE L., HENDRICK J.C., FRANCHIMONT P. et FAURE J.M.A. Dosage radio-immunologique par immunoabsorbant des gonadotrophines FSH et LH de lapin ; applications physiologiques. Ann. Endocr. <u>33</u> : 481-491 (1972)	(77)	21-22-79
- DUFY-BARBE L., DUFY B., FAURE J.M.A. et FRANCHIMONT P. Effets de la castration sur les taux sériques de FSH et de LH chez le lapin. C.R. Soc. Biol. <u>166</u> : 1649-1654 (1972)	(108)	82
- DUFY-BARBE L. et FRANCHIMONT P. Influence des différents stéroïdes gonadiques sur le taux de la FSH et de la LH chez le rat castré. C.R. Soc. Biol. <u>166</u> : 960-964 (1972)	(111)	83
- DUFY-BARBE L., FRANCHIMONT P. and FAURE J.M.A. Time course of LH and FSH release after mating in the female rabbit. Endocrinology <u>92</u> : 1318-1321 (1973)	(103)	81
- EKBLAD M., BEWLEY T.A. and PAPKOFF H. Circular dichroism studies on ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta <u>221</u> : 142-145 (1970)	(58)	10
- FEDER H.H., RESKO J.A. and GOY R.W. Progesterone concentrations in the arterial plasma of guinea-pigs during the oestrus cycle. J. Endocr. <u>40</u> : 505-513 (1968)	(106)	82
- FELDMAN H. and ROBBARD D. Mathematical theory of radioimmunoassay, in W.D. ODELL and W.H. DAUGHADAY. Principles of competitive binding assays. Lippincott, Phil., 158 (1971)	(89)	44

- |  | Réf. | Pages |
|--|------|-------|
| - FERIN M., CARMEL P.W., ZIMMERMAN E.A., WARREN M.,<br>PEREZ R. and VAN DE WIELE R.L.<br>Localization of intrahypothalamic estrogen responsive sites influencing LH secretion in the female Rhesus monkey.<br>Endocrinology <u>95</u> : 1059-1068 (1974) | (30) | 6     |
| - FLERKO B.<br>Effect of experimental hypothalamic lesions on inhibition of luteinization induced indirectly by the follicle stimulating hormone.<br>Endokrinologie (Leipzig) <u>34</u> : 202-208 (1957)   | (15) | 4     |
| - FLERKO B.<br>Role of hypothalamic structures in the inhibitory action of folliculin on secretion of follicle stimulating hormone.<br>Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp. <u>46</u> : 159-172 (1957)   | (16) | 4     |
| - FLERKO B.<br>In "Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary" (SZENTAGOTHAI J., FLERKO B., MESS B. and HALASZ B., eds) : 192-265, Akademiai Kiado Budapest (1962)   | (8)  | 2     |
| - FLERKO B. and SZENTAGOTHAI J.<br>Oestrogen sensitive nervous structures in the hypothalamus.<br>Acta Endocrinol. <u>26</u> : 121-127 (1957)  | (19) | 4     |
| - FLERKO B. and BARDOS V.<br>Pituitary hypertrophy after anterior hypothalamic lesion.<br>Acta Endocrinol. <u>35</u> : 375-380 (1960)  | (17) | 4     |

	Réf.	Pages
- FOLLET B.K., SCANES C.G. and NICHOLLS J.J. The chemistry and physiology of the avian gonadotropins. Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophysaires : 193-211 (1972)	(99)	79
- FRANCHIMONT P. Etude du dosage de certaines hormones hypophysaires vol. 1 : 141 (Arscia Bruxelles ; Maloine Maris) (1964)	(76)	21
- FRANCHIMONT P. Le dosage des hormones hypophysaires somatotrope et gonadotropes et son application clinique. (Arscia Bruxelles ; Maloine Paris) (1966)	(79)	24
- FRANCHIMONT P. Sécrétion normale et pathologique de la somatotrophine et des gonadotrophines humaines. Masson, Paris (1971)	(113)	5
- FRANCHIMONT P. Human gonadotrophin secretion. J. Roy. Coll. Physicians (Lond.) <u>6</u> : 283-298 (1972)	(104)	82
- FRANCHIMONT P., CHARI S. and DEMOULIN A. Hypothalamus pituitary testis interaction. J. Reprod. Fert. <u>44</u> : 335-350 (1975)	(110)	83
- GODING J.R., CATT K.J., BROWN J.M., KALTENBACH C.C., CUMMING I.A. and MOLE B.J. Radioimmunoassay for ovine luteinizing hormone. Secretion of luteinizing hormone during estrus and following estrogen administration in the sheep. Endocrinology <u>85</u> : 133-142 (1969)	(26)	6

- |  | Réf. | Pages    |
|--|------|----------|
| - GREENWOOD F., HUNTER W. and GLOVER S.<br>Preparation of <sup>131</sup> I labelled human growth hormone<br>of high specific radioactivity.<br>Biochem. J. <u>89</u> : 114-121 (1963)  | (78) | 22       |
| - GUNAGA K.P. and MENON K.M.J.<br>Effect of catecholamines and ovarian hormones on<br>cyclic AMP accumulaton in rat hypothalamus.<br>Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>54</u> : 440-448 (1973)   | (28) | 6        |
| - HALASZ B., PUPP L. and UHLARIK S.<br>Hypophysiotrophic area in the hypothalamus.<br>J. Endocrinol. <u>25</u> : 147-154 (1962)  | (1)  | 2        |
| - HALASZ B. and PUPP L.<br>Hormone secretion of the anterior pituitary gland<br>after physical interruption of all nervous pathways<br>to the hypophysiotrophic area.<br>Endocrinology <u>77</u> : 553-562 (1965)                                | (2)  | 2        |
| - HALASZ B., PUPP L., UHLARIK S. and TIMA L.<br>Further studies on the hormone secretion of the an-<br>terior pituitary transplanted into the hypophysiotro-<br>phic area of the rat hypothalamus.<br>Endocrinology <u>77</u> : 343-355 (1965)   | (3)  | 2        |
| - HALASZ B. and GORSKI R.A.<br>Gonadotrophic hormone secretion in the female rats<br>after partial or total interruption of neural affe-<br>rents to the medial basal hypothalamus.<br>Endocrinology <u>80</u> : 608-621 (1967)                  | (6)  | 2-4      |
| - HENDRICK J.C., LEGROS J.J. et FRANCHIMONT P.<br>Le dosage radio-immunologique de la FSH de rat et<br>étude radio-immunologique de la réaction croisée<br>entre la FSH de rat, de mouton et de porc.<br>Ann. Endocr. <u>32</u> : 241-251 (1971) | (75) | 21-45-79 |

- |  | Réf.  | Pages |
|--|-------|-------|
| - HENDRICK J.C.<br>L'utilisation des immunoadsorbants en radioimmunologie.<br>Thèse de Doctorat, Université de Liège, Faculté de Médecine 141 p. (1972)  | (81)  | 28    |
| - JIRGENSONS B.<br>Optical rotatory dispersion of some pituitary hormones.<br>Archiv. Biochem. Biophys. <u>91</u> : 123-129 (1960)   | (64)  | 10    |
| - JOSHI H.S., WATSON D.J. and LABHSETWAR A.P.<br>Ovarian secretion of oestradiol, oestrone, 20 dihydroprogesterone and progesterone during the oestrus cycle of the guinea-pig.<br>J. Reprod. Fert. <u>35</u> : 177-181 (1973)   | (105) | 82    |
| - KAMBERI I.A., MICAL R.S. and PORTER J.C.<br>LH releasing activity in the hypophysial stalk blood and elevation by dopamine.<br>Science <u>166</u> : 388-390 (1969)   | (49)  | 7     |
| - KARSCH F.J., WEICK R.F., BUTLER W.R., DIERSCHKE D.J., KREY L.C., WEISS G., HOTCHKISS J., YAMAJI T. and KNOBIL E.<br>Induced LH surges in the rhesus monkey : strength-duration characteristics of the estrogen-stimulus.<br>Endocrinology <u>92</u> : 1740-1747 (1973) | (27)  | 6     |
| - KATO J. and VILLEE C.A.<br>Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat.<br>Endocrinology <u>80</u> : 567-575 (1967)   | (9)   | 4     |
| - KATO J.<br>Localization of oestradiol receptors in the rat hypothalamus.<br>Acta Endocrinologica <u>72</u> : 663-670 (1973)  | (14)  | 4     |





	Réf.	Pages
- Mc KENZIE J.M. Humoral factors in the pathogenesis of Graves'disease. Physiol. Rev. <u>48</u> : 252-310 (1968)	(74)	20
- KERCRET H., DUVAL J. Etude par électrofocalisation des gonadotrophines hypophysaires du rat. Biochimie <u>57</u> : 85-90 (1975)	(94)	79
- KERDELHUE B. and JUTISZ M. XI <sup>th</sup> Intern. Congress of Endocrinology Washington Excerpta Medica Amsterdam ICS n° 256 Abst. n° 352 (1972)	(38)	6
- KNIGGE K.M. Gonadotropic activity of neonatal pituitary glands implanted in the rat brain. Am. J. Physiol. <u>202</u> : 387-391 (1962)	(4)	2
- KNOBIL E. On the control of gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. Recent. Progr. Hormone Res. <u>30</u> : 1-46 (1974)	(36)	6
- KUTAS M., CHUNG A., BARTOS D. and CASTRO A. A simple progesterone radioimmunoassay without column chromatography. Steroids <u>20</u> , 6 : 697-716 (1972)	(84)	32
- LEGAN S.J. and KARSCH F.J. Recent studies of Hypothalamic Function. Int. Symp. Calgary (1973) 147-165 (Karger Basel 1974)	(25)	5
- LEONARDELLI J. Recherches sur les mécanismes de contrôle hypothala- mique de l'axe préhypophyso-ovarien chez le cobaye. Faculté de Médecine d'Alger, Alger (1961)	(86)	35

- |  | Réf. | Pages |
|--|------|-------|
| - LEONARDELLI J.<br>Modifications de la muqueuse vaginale du cobaye au cours du cycle oestral.<br>C.R. Soc. Biol. <u>155</u> : 2313-2314 (1961)  | (87) | 35    |
| - LEONARDELLI J.<br>Formation et évolution des corps progestatifs chez le cobaye. Etude caryométrique.<br>C.R. Soc. Biol. <u>156</u> : 58-60 (1962)  | (88) | 35    |
| - LEONARDELLI J.<br>Monoamines et fonction gonadotrope.<br>ds Fonction gonadotrope et rapports hypothalamo-hypophysaires chez les animaux sauvages.<br>HERLANT M. éd. Masson Paris : 110-127 (1971)  | (50) | 7     |
| - LEONARDELLI J., BARRY J. et DUBOIS M.P.<br>Mise en évidence par immunofluorescence d'un constituant immunologiquement apparenté au LH RF dans l'hypothalamus et l'éminence médiane chez les mammifères.<br>C.R. Acad. Sci. (Paris) <u>276</u> : 2043-2046 (1973) | (43) | 7     |
| - LEONARDELLI J., DUBOIS M.P. and POULAIN P.<br>Effect of exogenous serotonin on LH-RH secreting neurons in the guinea-pig hypothalamus as revealed by immunofluorescence.<br>Neuroendocrinology <u>15</u> : 69-72 (1974)  | (48) | 7     |
| - LIBERTUN C., ORIAS R. and Mc CANN S.M.<br>Biphasic effect of estrogen on the sensitivity of the pituitary to luteinizing hormone releasing factor (LRF).<br>Endocrinology <u>94</u> : 1094-1100 (1974)   | (24) | 5     |

- |  | Réf. | Pages |
|--|------|-------|
| - LINDNER H.R., PEREL E., FRIEDLAND A. and ZEITLIN A.<br>Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapton to the peptide carrier.<br>Steroids <u>19</u> : 357-375 (1972)                            | (85) | 32    |
| - MATSUO H., BABA Y., NAIR R.M.G., ARIMURA A. and SCHALLY A.V.<br>Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence.<br>Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>43</u> : 1334-1339 (1971)                                 | (33) | 6     |
| - MATSUO H., ARIMURA A., NAIR R.M.G. and SCHALLY A.V.<br>Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid phase method.<br>Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>45</u> : 822-827 (1971)   | (34) | 6     |
| - MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D. and REBAR R.W.<br>Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity).<br>Acta Endocr. Suppl <u>142</u> : 163-184 (1969)                             | (90) | 44    |
| - MONAHAN M., RIVIER J., BURGUS R., AMOSS M., BLACKWELL R., VALE W. et GUILLEMIN R.<br>Synthèse totale par phase solide d'un décapeptide qui stimule la sécrétion des gonadotrophines hypophysaire LH et FSH.<br>C.R. Acad. Sci. <u>273</u> : 508-510 (1971) | (37) | 6     |
| - NEGRO-VILAR A., ORIAS R. and Mc CANN S.M.<br>Evidence for a pituitary site of action for the acute inhibition of LH release by estrogen in the rat.<br>Endocrinology <u>92</u> : 1680-1684 (1973)  | (21) | 5     |

- |   | Réf. | Pages |
|---|------|-------|
| - NISWENDER G.D., MIDGLEY A.R. and REICHERT L.E.<br>Radioimmunologic studies with murine, bovine, ovine<br>and porcine luteinizing hormone ;<br>in Gonadotropins. E. ROSEMBERE, ed. Geron X Inc.<br>publ. Los Altos Calif. 299-306 (1968) | (92) | 50    |
| - NISWENDER G.D., MIDGLEY A.R., MONROE S.E. and<br>REICHERT L.E.<br>Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with<br>antiovine LH serum and ovine LH <sup>131</sup> I.<br>Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>128</u> : 807-811 (1968)      | (93) | 50    |
| - PAPKOFF H.<br>In Glycoproteins Ed. GOTTSCHALK, ELSEVIER, Amsterdam<br>New-York, 532 (1966)  | (65) | 10    |
| - PAPKOFF H., GOSPODAROWICZ D. and LI C.H.<br>Purification and properties of ovine follicle stimu-<br>lating hormone.<br>Arch. Biochem. Biophys. <u>120</u> : 434-439 (1967)  | (54) | 10    |
| - PARLOW A.F.<br>Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion<br>of ovarian ascorbic acid.<br>In "Human Pituitary Gonadotropins" (A. Albert, ed.)<br>C.C. THOMAS Springfield, Illinois, U.S.A., 300-310 (1961)                  | (73) | 20    |
| - PASTEELS J.L. et ECTORS F.<br>Niveau et mode d'action des stéroïdes génitaux sur le<br>contrôle des fonctions gonadotropes.<br>Colloque CNRS. Neuroendocrinologie, 339-349 (1969)   | (20) | 4-5   |
| - PFAFF D. and KEINER M.<br>Atlas of estradiol concentrating cells in the central<br>nervous system of the female rat.<br>J. Comp. Neurol. <u>151</u> : 121-157 (1973)  | (13) | 4     |

- |  | Réf.  | Pages |
|--|-------|-------|
| - PIERCE J.G., BAHL O.P., CORNWELL J.S. and SWAMINATHAN N.<br>Biologically active hormones prepared by recombination of the alpha chain of human chorionic gonadotropin and the hormone specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone.<br>J. Biol. Chem. <u>246</u> : 2321-2324 (1971) | (97)  | 79    |
| - PIERCE J.G., LIAO T.H., CORNWELL J.S. and CARLSEN R.B.<br>Protein and polypeptide hormones <u>91</u> (1971)  | (98)  | 79    |
| - POULAIN P.<br>Modifications de l'appareil génital du cobaye femelle après lésions stéréotaxiques de l'hypothalamus antérieur.<br>C.R. Soc. Biol. <u>162</u> : 1943-1945 (1968)   | (18)  | 4     |
| - REICHERT L.E. and MIDGLEY A.R.<br>Preparation of purified rat follicle stimulating hormone and luteinizing hormone.<br>Proc. Soc. Exp. Biol. Med. <u>128</u> : 1001-1004 (1968)  | (69)  | 11    |
| - REICHERT L.E.<br>Electrophoretic Properties of Pituitary Gonadotropins as studied by Electrofocusing.<br>Endocrinology <u>88</u> : 1029-1044 (1971)  | (114) | 79    |
| - RYAN R.J., JIANG N.S. and HANLON S.<br>Some physical and hydrodynamic properties of human FSH and LH.<br>Recent Prog. Horm. Res. <u>26</u> : 105-137 (1970)<br>Ed. E.B. Astwood. Acad. Press. New-York   | (60)  | 10    |
| - RYSZKA F.J., KOGAN G.A. et STRUCHKOVA M.J.<br>Molekularnaya Biologia <u>5</u> : 487 (1971)   | (57)  | 10    |

	Réf.	Pages
- SCHALLY A.V., BABA Y., ARIMURA A., REDDING T.W. and WHITE W.F. Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>42</u> : 50 (1971)	(52)	7
- SCHALLY A.V., ARIMURA A., BABA Y., NAIR R.M.G., MATSUO H., REDDING T.W., DEBELJUK L. and WHITE W.F. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>43</u> : 393-399 (1971)	(32)	6-7
- SCHALLY A.V., ARIMURA A., KASTIN A.J., BABA Y., REDDING T.W., NAIR R.M.G. and DEBELJUK L. Gonadotropin releasing hormones ; one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormone. Science <u>173</u> : 1036-1037 (1971)	(35)	6
- SHERWOOD O.D., GRIMEK H.J. and Mc SHAN W.H. Purification and properties of follicle stimulating hormone from sheep pituitary glands. J. Biol. Chem. <u>245</u> : 2328-2336 (1970)	(56)	10
- SIEVERTSSON H., CHANG J.K., CURRIE B.L., BOGENTOFT C., FOLKERS K. and BOWERS C.Y. On the structure of the luteinizing hormone releasing hormone (LRH) and the specificity of activity of LRH and the thyrotropin releasing hormone (TRH). Fed. Proc. <u>30</u> : 1193-1195 (1971)	(36)	6
- STEELMAN S.L. and POHLEY F.M. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. Endocrinology <u>53</u> : 604 (1953)	(72)	20
- STEELMAN S.L., SEGALOFF A. and MAYS M.G. Arch. Biochem. Biophys. <u>78</u> : 262 (1958)	(71)	13

- |   | Réf.  | Pages |
|---|-------|-------|
| - STOCKELL-HARTREE A.<br>A separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands.<br>Biochem. J. <u>100</u> : 754-761 (1966)  | (68)  | 11    |
| - STOCKELL-HARTREE A.<br>Human pituitary luteinizing hormone.<br>Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophysaires, 71-82 (1972)  | (61)  | 10    |
| - STUMPF W.E.<br>Estradiol concentrating neurons. Topography in the hypothalamus by dry-mount autoradiography.<br>Science <u>162</u> : 1001-1003 (1968)   | (10)  | 4     |
| - STUMPF W.E.<br>Hypophysiotropic neurons in the periventricular brain : topography of estradiol concentrating neurons ; in SAWYER and GORSKI Steroid hormones and brain function, 215-227 (Univ. Calif. Press, Los Angeles) (1971) | (11)  | 4     |
| - SZENTAGOTHAI J.<br>Progr. Brain Res. <u>5</u> : 135 (1964)  | (5)   | 2     |
| - VON ZUR MUHLEN A. and KOBBERLING J.<br>Effect of testosterone on the LH and FSH release induced by LH releasing factor (LRF) in normal men.<br>Horm. Metab. Res. <u>5</u> : 266-270 (1973)  | (109) | 83    |
| - WAREMBOURG M.<br>Fixation de l'oestradiol $^3\text{H}$ au niveau des noyaux amygdaliens, septaux et du système hypothalamo-hypophysaire chez la souris femelle.<br>C.R. Acad. Sci. <u>270</u> : 152-154 (1970)                    | (12)  | 4     |

- |   | Réf. | Pages |
|---|------|-------|
| - WEISSMAN B.A. and SKOLNICK P.<br>Stimulation of Adenosine 3', 5' - Monophosphate<br>Formation in Incubated Rat Hypothalamus by Estrogenic<br>Compounds : Relationship to Biologic Potency and<br>Blockade by Anti-Estrogens.<br>Neuroendocrinology <u>18</u> : 27-34 (1975) | (29) | 6     |
| - WIDE L.<br>Radioimmunoassays employing immunosorbants.<br>Acta Endocr. Copenh. Suppl <u>142</u> : 207 (1969)  | (82) | 28    |
| - YEN S.S.C., LLERENA O., LITTLE B. and PEARSON O.B.<br>Desappearance rates of endogenous luteinizing hormone<br>and chorionic gonadotropin in man.<br>J. Clin. Endocr. <u>28</u> : 1763 (1968)   | (39) | 6     |

