50376
1982
141

50376
1982
141

N° d'ordre : 536

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Dominique CROIX

ACTIVITÉ DES AXES GONADOTROPE ET CORTICOTROPE AU COURS DU CYCLE ŒSTRAL CHEZ LE COBAYE (*Cavia porcellus*) ET LE SINGE ÉCUREUIL (*Saimiri sciureus*) ÉTUDE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Soutenue le mercredi 3 février 1982, devant la Commission d'examen

MM. J. MONTREUIL, Président
J. BARRY, Rapporteur
C. ARON, Rapporteur
P. FRANCHIMONT, Rapporteur
J.-P. ROUSSEAU, Rapporteur
J. LEONARDELLI, Examinateur

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

- Laboratoire d'Histologie (Professeur Julien BARRY) - Faculté de Médecine de Lille.

- Unité I.N.S.E.R.M. de neuro-endocrinologie n° 156 (Professeur Julien BARRY). Lille.

- Laboratoire de Radio-Immunologie (Professeur Paul FRANCHIMONT) - Institut de Médecine. Université de Liège.

A ma Mère

A ma Grand'Mère

A ma Soeur

A Joseph

A ma fille.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Après m'avoir enseigné la Biochimie, vous m'avez permis d'effectuer mes premiers pas dans la Recherche. Je voudrais aujourd'hui vous exprimer mon admiration et ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Julien BARRY,

Vous m'avez accueillie dans votre Laboratoire.
Par la confiance que vous m'avez accordée et par les encouragements que vous m'avez prodigués, vous m'avez permis de mener à bien ce travail. Que cette thèse soit, pour moi, l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Claude ARON,

Votre renom scientifique est tel que je suis très honorée que vous ayez accepté d'examiner mon travail et d'en être rapporteur. Je vous adresse mes plus vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur Paul FRANCHIMONT,

Vous m'avez accueillie pendant huit mois dans votre Laboratoire pour un stage au cours duquel j'ai pu bénéficier de votre haute compétence en radio-immunologie ainsi que de vos encouragements. Je vous en suis très reconnaissante.

A Monsieur le Professeur Jean-Paul ROUSSEAU,

J'espère que vous aurez trouvé quelque intérêt à la lecture de cette thèse dont vous avez accepté fort aimablement d'être rapporteur. Je vous en remercie très vivement.

A Monsieur le Professeur Jean LEONARDELLI,

Vous avez eu le souci, au travers de discussions fort enrichissantes pour moi, de communiquer votre savoir et vos idées. Vous avez toujours répondu avec bienveillance aux conseils et à l'aide que je sollicitais de votre part et vous m'avez témoigné suffisamment de confiance pour m'offrir, à plusieurs reprises, de collaborer à vos recherches.
Soyez assuré de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Maurice-Paul DUBOIS, Directeur de Recherches,

Je voudrais vous remercier d'avoir pris sur votre temps pour m'enseigner la technique d'immunohémolyse passive indirecte, technique qui peut rendre de grands services, notamment dans les contrôles de spécificité des immunsérums, ainsi que de m'avoir donné de votre excellent antisérum anti-LRF.

A André VERBERT, Professeur,

Tu as guidé mes premiers pas dans la Recherche.
"L'étude du sens de la transcription dans les cellules des Eucaryotes..." me rappellera toujours ton enthousiasme scientifique qui fut pour moi un exemple.

Au Docteur Jean-Claude HENDRICK,

Pour m'avoir initiée aux techniques de radio-immunologie et m'avoir donné de tes très précieux antisérums anti-FSH et anti-LH ovines, je t'adresse un grand merci.

Je tiens également à remercier très sincèrement Bernard CARETTE, Danièle DENEUX, André PILLEZ et Gérard TRAMU pour l'aide amicale qu'ils m'ont toujours apportée.

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

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

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

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

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M.	GABILLARD Robert	Electronique
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M.	BACCHUS Pierre	Astronomie
M.	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M.	BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BIAYS Pierre	Géographie
M.	BILLARD Jean	Physique du Solide
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale

.../...

M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	COEURE Gérard	Analyse
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
P.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique

.../...

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Électrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

.../...

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

SOMMAIRE

INTRODUCTION . . . . . p. 1

TRAVAUX PERSONNELS . . . . . p. 22

MATERIEL ET METHODES p. 23

I - RECHERCHE DE SYSTEMES PERMETTANT LES DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES DE COBAYE ET DE SINGE ECUREUIL . . p. 23

A - PREPARATION DE FRACTIONS HYPOPHYSAIRES "FSH" et "LH" DE COBAYE . . . . . p. 23

1) Méthode par chromatographies sur échangeurs d'ions . . p. 24

a) Poudre acétonique . . . . . p. 24

b) Extraction des glycoprotéines . . . . . p. 24

c) Séparation de FSH et de LH . . . . . p. 26

d) Purification de la fraction FSH . . . . . p. 27

2) Méthode d'extraction et de fractionnement au sulfate d'ammonium . . . . . p. 27

a) Purification de la FSH . . . . . p. 29

b) Purification de la LH . . . . . p. 29

B - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES . . . . . p. 30

1) Préparations hormonales utilisées . . . . . p. 30

a) Pour le marquage . . . . . p. 30

b) Pour les courbes de références et les contrôles de spécificité . . . . . p. 31

c) Extraits antéhypophysaires de cobaye ou de singe écureuil . . . . . p. 31

2) Antisérums utilisés . . . . . p. 32

3) Marquage . . . . . p. 32

4) Techniques de dosages . . . . . p. 36

a) Immunoprécipitation ou technique du "double anticorps", à 4°C . . . . . p. 36

b) Immunoprécipitation à température ambiante . . . . . p. 36

c) Immunoadsorption . . . . . p. 37
d) Dosage des gonadotrophines dans les sérums de cobayes et de singes . . . . . p. 39

II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17β OESTRADIOL . . . . . p. 41

A - DOSAGE DE LA PROGESTERONE . . . . . p. 41

1) Extraction de la progestérone contenue dans les échantillons de sérum . . . . . p. 41
2) Dosage . . . . . p. 41

B - DOSAGE DE L'OESTRADIOL . . . . . p. 44

1) Extraction de l'oestradiol contenu dans les échantillons de sérum . . . . . p. 44
2) Dosage . . . . . p. 44

III - DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU LRF . . . . . p. 45

A - MARQUAGE DU LRF . . . . . p. 47

1) Réaction . . . . . p. 47
2) Chromatographie . . . . . p. 47

a - sur Séphadex G 25 . . . . . p. 47
b - sur QAE-Séphadex A 25 . . . . . p. 47

B - EXTRAITS TISSULAIRES . . . . . p. 51

C - ANTISERUMS . . . . . p. 53

D - DOSAGE . . . . . p. 55

IV - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE L'ACTH ET DU CORTISOL . . . p. 56

A - DOSAGE DE L'ACTH . . . . . p. 56

1) Prélèvement des échantillons . . . . . p. 57
2) Dosage . . . . . p. 57

B - DOSAGE DU CORTISOL . . . . . p. 59

V - ANIMAUX . . . . . p. 62

A - COBAYES . . . . . p. 62

1) Injection LRF . . . . . p. 62
2) Castration . . . . . p. 62
3) Cycle oestral . . . . . p. 62

B - SINGES ECUREUILS . . . . . p. 67

1) Injection LRF - Castration . . . . . p. 67
2) Cycle oestral . . . . . p. 67

RESULTATS . . . . . p. 68

I - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES . . . . . p. 69

A - ETABLISSEMENT DES COURBES DE REFERENCES . . . . . p. 69

1) Expression des résultats . . . . . p. 69
2) Antisérums . . . . . p. 69

a) Systèmes homologues de rat . . . . . p. 69
b) Systèmes hétérologues . . . . . p. 69
c) Systèmes homologues humains . . . . . p. 70

3) Reproductibilité . . . . . p. 70
4) Sensibilité . . . . . p. 71

B - OBTENTION DE SYSTEMES PERMETTANT LES DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES DE COBAYE ET DE SINGE ECUREUIL . . . . . p. 72

1) Dosage de la FSH . . . . . p. 72

a) Système homologue de rat . . . . . p. 72
b) Systèmes hétérologues . . . . . p. 72

α. comprenant de la FSH marquée de rat et des antisérums anti FSH ovine p. 72
β. comprenant de la FSH marquée de rat et des antisérums anti FSH humaine p. 78

c) Système homologue humain . . . . . p. 80

2) Dosage de la LH . . . . . p. 82

a) Système homologue de rat . . . . . p. 82

b) Systèmes hétérologues . . . . . p. 82
c) Systèmes homologues humains . . . . . p. 85

II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17 β OESTRADIOL . . . . . p. 90
A - Dosage de la progestérone . . . . . p. 90
B - Dosage de l'oestradiol . . . . . p. 91

III - DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU LRF . . . . . p. 92

IV - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE L'ACTH ET DU CORTISOL . . p. 95
A - Dosage de l'ACTH . . . . . p. 95
B - Dosage du cortisol . . . . . p. 96

V - EXPRESSION DES RESULTATS ET REPRESENTATION GRAPHIQUE CONCERNANT LES VARIATIONS DES TAUX HORMONAUX TISSULAIRES ET SERIQUES . . . . . p. 97

VI - INJECTIONS DE LRF - CASTRATION . . . . . p. 99
A - Cobayes . . . . . p. 99
1) Injection de LRF . . . . . p. 99
2) Castration . . . . . p. 99
B - Singes écureuils . . . . . p. 101
1) Injection de LRF . . . . . p. 101
2) Castration . . . . . p. 101

VII - CYCLE OESTRAL DU COBAYE . . . . . p. 102
A - LH . . . . . p. 102
1) LH sérique . . . . . p. 102
2) LH préhypophysaire . . . . . p. 102
B - FSH . . . . . p. 106
1) FSH sérique . . . . . p. 106
2) FSH préhypophysaire . . . . . p. 107
C - Progestérone . . . . . p. 108
D - Oestradiol . . . . . p. 110
E - LRF . . . . . p. 111
F - ACTH . . . . . p. 118
G - Cortisol . . . . . p. 120

VIII - CYCLE OESTRAL DU SINGE ECUREUIL p. 121

A - LH . . . . . p. 121
B - FSH . . . . . p. 121
C - Progestérone . . . . . p. 121
D - LRF . . . . . p. 125
E - Cortisol . . . . . p. 128

DISCUSSION . . . . . p. 130

CONCLUSION . . . . . p. 151

I - Mise au point de systèmes de dosages radio-immunologiques de la FSH et de la LH de cobaye . . . . . p. 152

II - Mise au point de systèmes de dosages radio-immunologiques de la FSH et de la LH de singe écureuil . . p. 153

III - Mise au point d'un dosage radio-immunologique du LRF tissulaire . . . . . p. 154

IV - Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope au cours du cycle oestral chez le cobaye . . . . . p. 154

V - Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope au cours du cycle oestral chez le singe écureuil. . p. 156

VI - Activité de l'axe corticotrope au cours du cycle oestral chez le cobaye et le singe écureuil . . . . p. 156

BIBLIOGRAPHIE. . . . . p. 158

ABREVIATIONS

AA : acide aminé

Ac : anticorps

ACTH : corticotropine (adrenocorticotropic hormone)

AMP : adénosine monophosphate

CBG : transcortine (corticotropin binding globulin)

CM cellulose, carboxyméthyle cellulose

c.p.m. : coups par minute

CRF : corticolibérine (corticotropin-releasing factor)

d.d.l. ; degrés de liberté

DEAE cellulose, diéthylaminoéthyle cellulose

D.O. 280 : densité optique à 280 nm

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

FSH : follitropine (follicle-stimulating hormone)

GH : somatotropine (growth hormone)

HCG : gonadotropine chorionique humaine (human chorionic gonadotropin)

HSA : sérumalbumine humaine (human serumalbumin)

LH : lutropine (luteinizing hormone)

LH-FSH-RH, LRF, gonadolibérine (LH-FSH-releasing hormone/factor)

mCi : 10^{-3} curie

OVLT : organe vasculaire de la lame terminale

POPOP : 1,4-bis- (2-(5 phényloxazolyl)) benzène

PPO : 2-5 diphényloxazol

QAE Séphadex : diéthyle (2 hydroxypropyle) aminoéthyle Séphadex

rpm : révolutions par minute

TRF : thyrolibérine (thyrotropin-releasing factor)

Tris : amino-2 hydroxyméthyl-2 propanediol 1,3

TSH : thyrotropine (thyroïd-stimulating hormone)

INTRODUCTION

Les hormones gonadotropes : LH ("luteinizing hormone") et FSH ("follicle stimulating hormone"), élaborées dans le lobe antérieur de l'hypophyse par des cellules basophiles, conditionnent les activités gamétogénétiques et endocrines des gonades.

Leur sécrétion se trouve sous le contrôle de structures hypothalamiques.

Déjà en 1955 HARRIS, BENOIT et ASSENMACHER avaient suggéré que le contrôle de la glande pituitaire serait de type "neurohumoral".

La première hormone hypothalamique hypophysiotrope détectée fut le CRF ("corticotropin releasing factor"). Bien que de nombreuses tentatives d'isolement de ce CRF aient été effectuées, le problème est resté longtemps irrésolu car, d'une part, il fut longtemps difficile d'éliminer les interférences dues aux contaminations par la vasopressine et par des peptides à activité "ACTH-like", d'autre part, il semblait y avoir plusieurs molécules possédant une activité CRF, ces molécules nécessitant la présence de vasopressine pour être actives.
Le CRF vient d'être isolé par VALE et Coll. 1981 ; il s'agit d'un peptide de 41 acides aminés.

En 1960, Mc CANN et Coll. ont montré que l'hypothalamus de rat contenait une substance capable de stimuler la cession de LH par l'antéhypophyse. Par des dosages biologiques, Mc CANN 1962, a pu localiser cette substance dans les régions de l'aire préoptique , l'aire suprachiasmatique, l'éminence médiane et le noyau arqué. Les travaux de HALASZ et Coll. 1962-1965 a, b et KNIGGE 1962 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. 2), d'où sont issues les fibres du tractus tubéro-infundibulaire mis en évidence par SZENTAGOTHAI 1964 par la technique de GOLGI. Ces fibres se terminent au niveau des capillaires du plexus porte primaire.

HALASZ et GORSKI 1967, par interruption des connexions 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

Planche I : Représentation schématique de l'hypothalamus de cobaye (coupe sagittale)

AHA : Aire hypothalamique antérieure

AHP : Aire hypothalamique postérieure

APO : Aire préoptique

CBA : Commissure blanche antérieure

CM : Corps mamillaire

CO : Chiasma optique

em : éminence médiane

f : fente hypophysaire

F : Fornix

la : lobe antérieur)
li : lobe intermédiaire) hypophyse
ln : lobe nerveux)

M : Mésencéphale

na : noyau arqué

nbd : noyau des bandelettes diagonales de BROCA

ndm : noyau dorsomédian

npm : noyau prémamillaire

npv : noyau paraventriculaire

nsc : noyau suprachiasmatique

nso : noyau supraoptique

nsod : noyau supraoptique diffus

nvm : noyau ventromédian

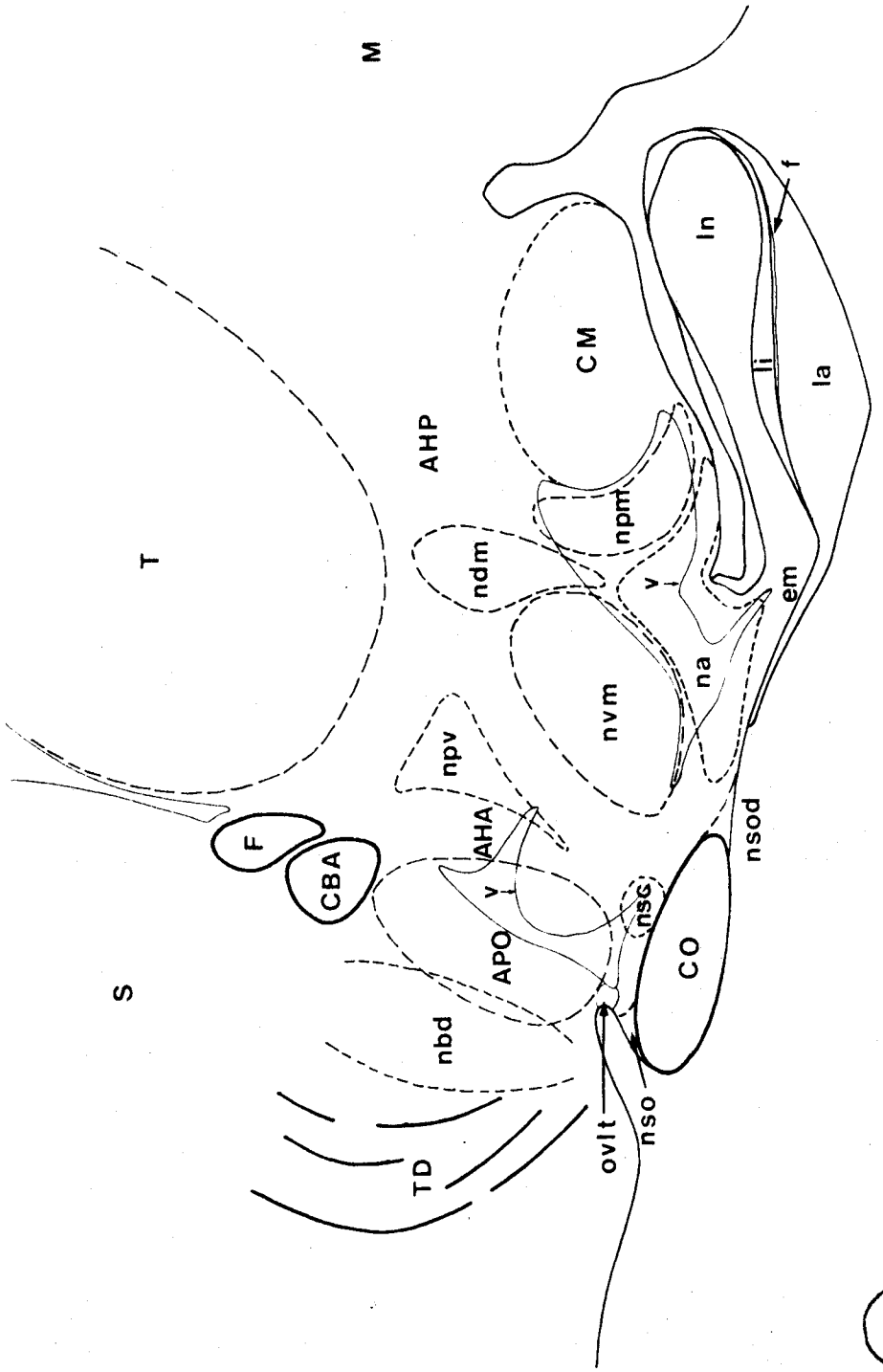
ovlt : organe vasculaire de la lame terminale (crête supraoptique ou suprachiasmatique)

S : Septum

T : Thalamus

TD : Tractus diagonal de BROCA

v : IIIème ventricule


M
S
T
AHP
CM
In
f
li
la
em
ndm
npm
v
na
nvm
npv
AHA
v
F
CBA
APO
nbd
TD
nsG
CO
nsod
ovlt
nso

BUS LILLE

à confirmer les hypothèses émises par BARRACLOUGH et GORSKI 1961 et FLERKO 1962, 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.

Le LRF ("luteinizing releasing factor") a été isolé en 1971 par SCHALLY et son équipe (a) ; sa structure a été établie : il s'agit d'un décapeptide (MATSUO et Coll. 1971 b, SCHALLY et Coll. 1971 b, SIEVERTSSON et Coll. 1971) ; sa synthèse a alors été effectuée (MATSUO et Coll. 1971 a, MONAHAN et Coll 1971), ainsi que la préparation d'antisérums très spécifiques (KERDELHUE et JUTISZ 1971, ARIMURA et Coll. 1973, DUBOIS 1973, BARRY et CROIX 1978, BARRY 1980).

Ces antisérums, utilisés dans différentes techniques d'immunocytochimie (immunofluorescence indirecte, techniques immunoenzymatiques indirectes, techniques aux complexes solubles de peroxydase-antiperoxydase de STERNBERGER) conduisirent à l'identification des neurones à LRF.

Ainsi, en immunofluorescence, des axones réagissant spécifiquement avec des antisérums anti-LRF de synthèse, ont été mis en évidence pour la première fois par LEONARDELLI, BARRY, DUBOIS (1973 a) chez le cobaye. Ces axones se terminent autour des capillaires du plexus porte primaire de l'hypophyse ; ils forment ce que BARRY et DUBOIS (1973 a) ont appelé alors la "voie préoptico-infundibulaire à LRF".

Les observations effectuées lors de différents états physiologiques : période périnatale (BARRY et DUBOIS 1974 a), gestation (BARRY et DUBOIS 1973 b), cycle oestral (BARRY et DUBOIS 1974 b) et expérimentaux (BARRY et Coll. 1974, LEONARDELLI et Coll. 1974), ont permis de penser que ces neurones élaboraient effectivement le LRF.

Des réseaux de fibres à LRF ont pu être très vite décrits dans diverses espèces animales (références détaillées dans BARRY 1979 a) et notamment chez de nombreux mammifères (bélier, taureau, souris, rat, chat, chien, lapin, ... Singes, Homme), chez les oiseaux (canard, coq) et également chez les amphibiens et les poissons.

En revanche, la mise en évidence des péricaryons s'est avérée plus difficile ; elle fut d'abord un échec en raison de la faible concentration en matériel réactif présent dans les corps cellulaires chez l'animal adulte normal.

Ce fut chez des cobayes castrés (afin de lever l'inhibition due aux androgènes) et après injection intra-ventriculaire cérébrale de colchicine (afin de bloquer la migration intra-axonale du peptide) que BARRY et Coll. (1973 c) ont observé, pour la première fois en immunofluorescence, des péricaryons de neurones à LRF ; dans ces conditions favorables, quelques centaines de corps cellulaires peuvent être décelés. Ces cellules ont ensuite pu être observées chez l'animal non traité, mais en nombre beaucoup moins important (BARRY et Coll. 1974).

Ils ont également été décrits ensuite dans d'autres espèces (Réf. dans BARRY - 1979 a). Ces neurones présentent des caractéristiques morphologiques comparables. Leur diamètre est de 10 à 40 µm, suivant l'espèce ; le noyau, d'un diamètre de 10 à 14 µm, n'est pas réactif ; seul le cytoplasme des cellules, finement granulaire, est réactif ; il peut contenir quelques lipofuschines. Très peu de dendrites (2 à 4) sont visibles ; ils sont très finement branchés et leur cytoplasme est granulaire.
Le matériel réactif n'est que très rarement accumulé dans le segment proximal de l'axone (BARRY et DUBOIS 1974 a). Les axones ont une apparence nodulaire caractéristique et possèdent des terminaisons collatérales perpendiculaires souvent fortement marquées (BARRY et Coll. 1973 c, BARRY et DUBOIS 1973 a).

Des cellules à LRF ont été étudiées également en microscopie électronique, au niveau du noyau arqué chez le rat (NAIK, 1975) - mais ces premières images n'étaient pas très convaincantes et la présence de cellules à LRF dans le noyau arqué chez le rat est aujourd'hui très controversée (KAWANO H. and DAIKOKU S. 1981) - mais surtout au niveau de la lame terminale chez le singe écureuil (Saimiri sciureus) par MAZZUCA 1977.

Elles contiennent des grains de sécrétion de 90-130 nm, réactifs avec des antisérums anti-LRF, localisés contre la membrane plasmique ou associés aux dictyosomes de l'appareil de GOLGI ; en outre ces cellules possèdent un réticulum endoplasmique rugueux très développé. Ces caractères semblent bien confirmer le rôle sécrétoire de ces neurones et le stockage de LRF dans les grains.

Des grains immunoréactifs ont aussi été observés près des espaces péricapillaires à la périphérie de l'organe vasculaire de la lame terminale ou encore entre des épendymocytes près du ventricule, éléments en faveur d'une décharge de LRF, d'une part dans les capillaires sanguins et, d'autre part, dans le troisième ventricule.

Etant donné la grande quantité de fibres à LRF observées par rapport

au nombre de corps cellulaires, tous les péricaryons de neurones à LRF ne sont probablement pas décelables par les techniques d'immunofluorescence et d'immunocytochimie utilisées ; les péricaryons non décelés contiennent trop peu de LRF (puisque des méthodes telles que la castration et l'injection intracérébrale de colchicine, ou de substances parmi lesquelles la mélatonine (BARRY et Coll. 1974), le sulpiride, la sérotonine, la prolactine (LEONARDELLI et Coll. 1973 b, 1974, 1977 ; BARRY et POULAIN 1976 ; BARRY et Coll. 1978), permettent d'en révéler certains supplémentaires) mais il est également possible qu'ils contiennent du LRF sous une forme différente - le LRF pourrait être synthétisé sous la forme d'un précurseur de haut poids moléculaire (MILLAR et Coll. 1977) - dont les sites antigéniques seraient masqués.

Il faut noter également qu'une substance réagissant, en immunofluorescence, avec un anti-$ACTH_{17-39}$, a été détectée dans les corps cellulaires et les axones de neurones à LRF chez le cobaye (TRAMU et Coll. 1977).

Les péricaryons à LRF ont une topographie très dispersée. Chez le cobaye (BARRY et Coll. 1973 c ; LEONARDELLI et Coll. 1973 b ; SETALO et Coll. 1976 ; SILVERMAN 1976 ; HOFFMAN 1976 ; WEINDL et SOFRONIEW 1978 ; KREY et SILVERMAN 1978), les deux groupes les plus importants, en intensité de réactivité et en nombre, se situent bilatéralement :

1°) dans l'hypothalamus antérieur essentiellement au niveau de la crête supra-optique et des régions périventriculaires (lame terminale, portion préoptique du noyau suprachiasmatique, aire hypothalamique antérieure, noyau du lit de la strie terminale).

2°) dans la région septo-préoptique (septum, aire péricommissurale, aire préoptique moyenne, noyau septomédian, noyau de la bandelette diagonale de BROCA).

3°) un troisième groupe de neurones à LRF se situe dans l'hypothalamus médiobasal ; s'ils sont peu nombreux et très disséminés, ils pourraient néanmoins jouer un rôle physiologique important ; ce sont les péricaryons de la région rétrochiasmatique, du noyau arqué et de l'aire prémammillaire. Rares dans le noyau arqué chez l'adulte (SILVERMAN 1976), ils sont plus nombreux chez le foetus (SCHWANZEL-FUKADA et SILVERMAN 1978).

On peut décrire encore d'autres groupes de neurones à LRF :

4°) les péricaryons des zones para-olfactives.

5°) Les péricaryons de l'amygdale.

6°) en arrière des corps mammillaires, les péricaryons du mésencéphale rostral.

Sans que l'on ait pu relier encore de façon précise et définitive ces différents groupes de péricaryons aux différents faisceaux de fibres à LRF observés, les techniques d'immunocytochimie, d'autoradiographie et d'électrophysiologie ont conduit les auteurs à tenter de dresser une carte approximative (mais qui reste hypothétique) de la topographie des neurones à LRF (Planche II, p. 7, Planche III, p. 8, Planche IV, p. 9).

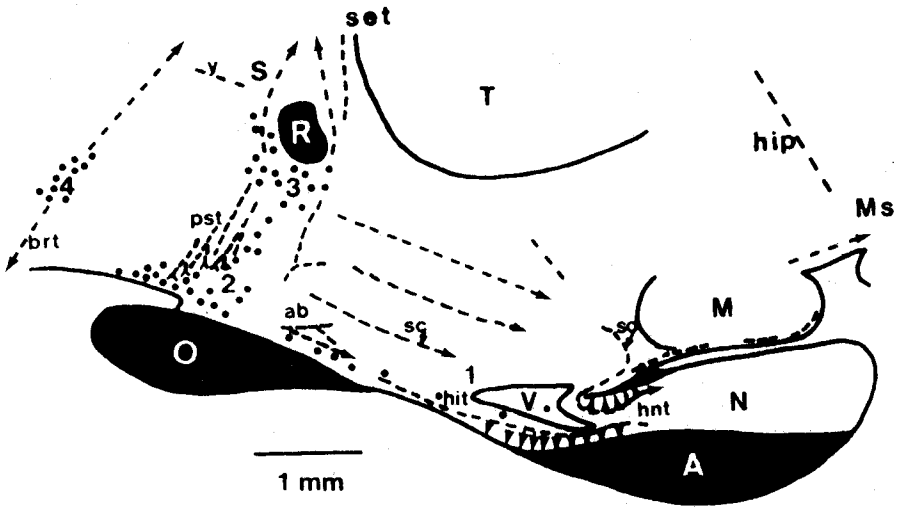
Ainsi chez le cobaye, il existerait :

1°) le tractus hypothalamo-infundibulaire, appelé initialement "tractus préoptico-infundibulaire" par BARRY et Coll. 1973 c, 1974, BARRY et DUBOIS 1974 b ; l'origine des fibres de ce tractus est encore incertaine ; elles proviendraient :
- pour une part des péricaryons de l'hypothalamus médiobasal dont les axones se projetteraient dans les zones externes de l'éminence médiane, plus particulièrement dans la portion médiane dorsale de la tige infundibulaire et dans l'éminence médiane post-infundibulaire. En effet, si la déconnexion de l'hypothalamus médiobasal (SILVERMAN 1976) provoque une diminution de réactivité dans l'éminence médiane, le nombre de fibres immunoréactives infundibulaires ne décroît pas de façon notable, alors qu'il décroît considérablement (95 p. 100) après destruction du noyau arqué (KREY et SILVERMAN 1978).
- pour une autre part de neurones préoptiques, dont les axones traverseraient ventralement l'aire suprachiasmatique puis la région rétrochiasmatique et se projetteraient pour la plupart dans la zone interne de l'éminence médiane et pour quelques-uns dans les surfaces ventrale et latérales de la tige infundibulaire. Ces trajectoires seraient en accord avec le fait que des lésions de l'aire préoptique médiane ou de l'aire suprachiasmatique provoquent une déplétion du matériel immunoréactif des fibres et des terminaisons nerveuses de ces zones de l'éminence médiane. Des lésions dans les autres régions (aire septale, corps mammillaires, noyau amygdalien, fornix) n'ont aucun effet (KREY et SILVERMAN 1978). Ces axones se terminent autour des capillaires fenêtrés du système porte primaire (plexus intercalaire et anses infundibulaires) dans lesquels ils déversent le LRF, celui-ci gagnant l'adénohypophyse par voie hémale, peut alors contrôler la libération des gonadotrophines LH et FSH.

Planche II :

Systématisation des neurones à LRF chez le cobaye, d'après BARRY (1979 a)

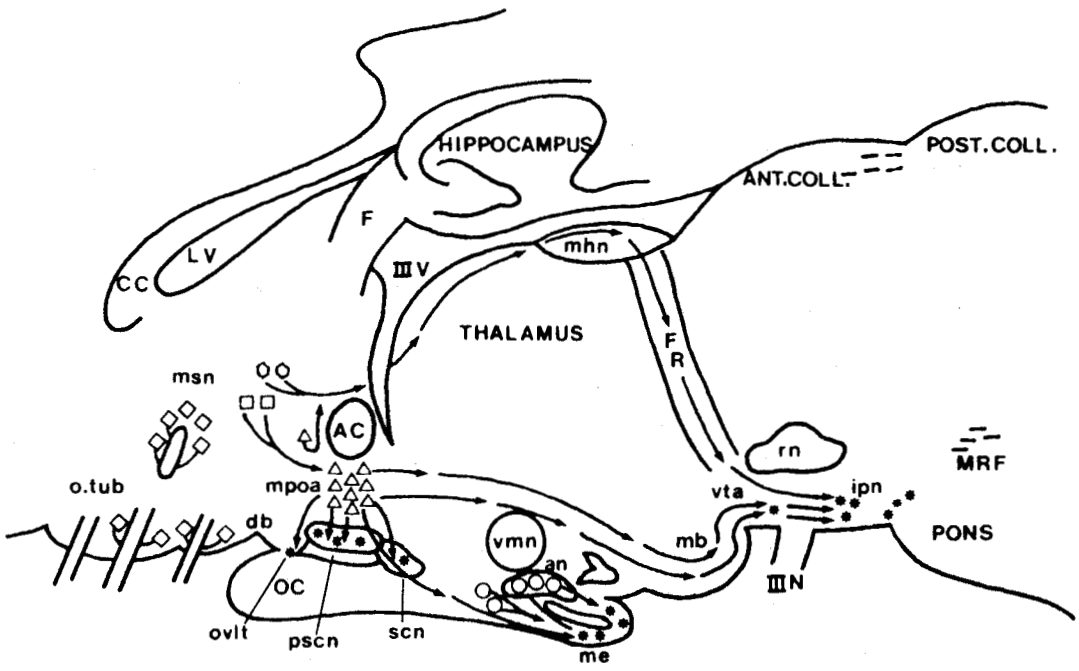
1 : péricaryons de l'hypothalamus médiobasal
2 : péricaryons de la zone préoptico-terminale
3 : péricaryons de l'aire péricommissurale rostrale
4 : péricaryons de la zone paraolfactive
A : Adénohypophyse
M : Corps mamillaire
Ms : Mésencéphale
N : lobe nerveux de l'hypophyse
O : Chiasma optique
R : Commissure rostrale
S : Septum
T : Thalamus
V : IIIème ventricule
ab, brt, hip, hit, hnt, pst, sc, set : différents trajets des fibres immunoréactives.



SUS LILLE

Planche III : Systématisation des neurones à LRF chez le cobaye, d'après SILVERMAN et KREY (1978)

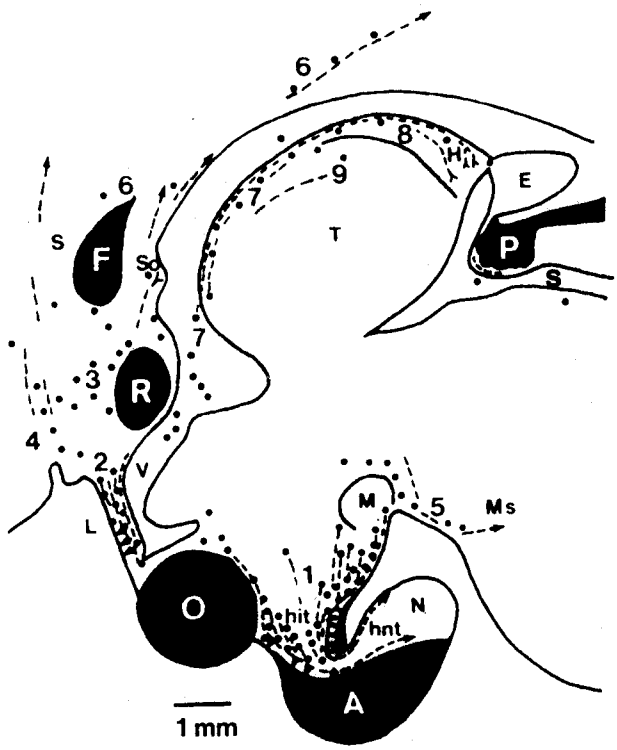
AC	: Commissure blanche antérieure
an	: noyau arqué
Ant. coll.	: colliculus antérieur
CC	: corps calleux
db	: noyau des bandelettes diagonales de BROCA
F	: Fornix
FR	: Fasciculus retroflexus
ipn	: noyau interpédonculaire
LV	: ventricule latéral
mb	: corps mamillaire
me	: éminence médiane
mhn	: noyau habénulaire médian
mpoa	: aire préoptique médiane
msn	: noyau septomédian
MRF	: formation réticulaire mésencéphalique
OC	: chiasma optique
o. tub.	: tubercules olfactifs
ovlt	: organe vasculaire de la lame terminale
Post. coll.	: colliculus postérieur
pscn	: portion préoptique du noyau suprachiasmatique
rn	: noyau rouge
scn	: noyau suprachiasmatique
III V	: IIIème ventricule
vmn	: noyau ventromédian
vta	: aire tegmentale ventrale


HIPPOCAMPUS
POST.COLL.
ANT.COLL.
F
LV
CC
IIIV
mhn
THALAMUS
FR
msn
AC
rn
MRF
o.tub
mpoa
vta
ipn
db
vmn
mb
PONS
an
IIIN
OC
ovlt
pscn
scn
me

BIIS LILLE

Planche IV : Systématisation des neurones à LRF chez le singe écureuil, d'après BARRY (1979 a)

1 : péricaryons de l'hypothalamus médiobasal
2 : péricaryons de la zone préoptico-terminale
3 : péricaryons de l'aire péricommissurale rostrale
4 : péricaryons de la zone paraolfactive
5 : péricaryons du mésencéphale rostral
6 : péricaryons de la zone limbique rostrale
7 : péricaryons septoépithalamiques
8 : péricaryons habénulaires
9 : péricaryons du thalamus médian
E : Epiphyse
F : Fornix
H : Ganglion habénulaire
L : Lame terminale
P : Commissure blanche postérieure
S : aqueduc de Sylvius
SO : Organe subfornical
(autres abréviations : cf. planche II, p. 7)


6
8
H
E
9
7
T
P
S
6
S
F
So
7
3
R
4
2
V
L
M
5
Ms
1
O
hit
N
hnt
A
1 mm

Certains de ces axones se prolongent jusque dans la posthypophyse (SILVERMAN et ZIMMERMAN 1978), formant le tractus hypothalamo-neurohypophysaire.

2°) le tractus préoptico-terminal ; ce tractus serait formé par des neurones ayant leurs corps cellulaires principalement dans la lame terminale (qui s'étend du chiasma optique à la commissure blanche antérieure du troisième ventricule), dans la région préoptique ou, pour quelques-uns d'entre eux, dans l'hypothalamus antérieur (mis en évidence également chez les primates BARRY et CARETTE 1975, BARRY et Coll.1976ab); leurs axones se terminent au niveau de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT). En effet, des lésions de l'aire préoptique médiane ou de la lame terminale font chuter considérablement le marquage des axones au niveau de l'OVLT, en revanche les autres lésions (y compris celles du noyau arqué) n'affectent pas ces axones (SILVERMAN et KREY 1978). Ce réseau vasculaire possède des capillaires fenêtrés (Réf. dans BOUCHAUD 1975 ; WEINDL et SOFRONIEW 1978) dans lesquels le LRF peut être déversé ; le sang veineux est ensuite drainé dans la circulation générale, dans les capillaires de la région médio-préoptique (PALKOVITS et Coll. 1978) ou de l'aire péricommissurale rostrale (WEINDL et SOFRONIEW 1978). Il ne semble pas y avoir de connexions avec le système porte hypophysaire.

En outre des axones de ce tractus préoptico-terminal pourraient atteindre et traverser la limitante gliale ou envoyer de fines terminaisons nerveuses entre les épendymocytes bordant le troisième ventricule (BARRY, 1978), laissant supposer une action possible du LRF par l'intermédiaire du liquide céphalo-rachidien.

3°) le tractus préoptico-supraoptique (BARRY et Coll. 1973 c, 1974 ; BARRY et DUBOIS 1974 c) dont les axones, issus de l'hypothalamus rostral et de l'aire péricommissurale, se dirigent bilatéralement vers la crête supraoptique et la région suprachiasmatique. Ce tractus, à la différence du tractus préoptico-terminal qui, lui, est important dans de nombreuses espèces animales, semble assez particulier au cobaye.

4°) certains neurones du septum, de la bandelette diagonale de BROCA, de l'aire péricommissurale et de l'aire préoptique médiane, projettent leurs axones dans l'hypothalamus dorsomédian ; ces axones convergent vers la capsule fibreuse se trouvant sous les corps mamillaires et se poursuivent vers l'aire tegmentale ventrale et le mésencéphale.

5°) le tractus septo-épithalamique habénulaire et thalamique (BARRY 1979 a). Il se compose de neurones du septum, de l'aire préoptique médiane, de la bandelette diagonale de BROCA ainsi que de quelques neurones épithalamiques ou habénulaires. Leurs axones passent par la strie médullaire et se terminent dans le noyau médian de l'habénula ou dans le noyau thalamique médiodorsal ; certains d'entre eux, par la voie du fasciculus rétroflexus, se dirigeraient vers le ganglion interpédonculaire (SILVERMAN et ZIMMERMAN 1978) ; d'autres pourraient gagner le colliculus supérieur où des fibres réactives ont également été observées, mais ceci est très hypothétique.

6°) le tractus limbique rostral dont les axones partent de la commissure blanche antérieure et se rendent dans le télencéphale (BARRY et DUBOIS 1976, BARRY et Coll. 1976 a ; mis en évidence également chez le lapin BARRY 1976 a, et le singe écureuil BARRY 1976 b, 1978).

7°) le groupe des neurones se situant dans la substance antérieure perforée des tubercules olfactifs et dont les axones se terminent autour des larges vaisseaux sanguins de cette région. Ce groupe semble assez délimité, en effet les lésions des autres groupes de cellules à LRF n'affectent pas l'intensité du marquage des cellules et des fibres de cette zone (SILVERMAN et KREY 1978).

8°) le tractus hypothalamo-amygdalien (BARRY et Coll. 1973 c, LEONARDELLI et POULAIN 1977). Les axones de ce tractus se terminent au niveau des noyaux amygdaliens basomédians.

Ces différents tractus ressemblent aux tractus neuro-sécrétoires extrahypophysaires, originaires des noyaux paraventriculaire et supraoptique décrits par BARRY 1954 , à l'aide de techniques de GOMORI chez la chauve-souris Rhinolophus.

La topographie et l'importance respectives des tractus de neurones à LRF peuvent être quelque peu différentes selon l'espèce. Par exemple :

- le tractus préoptico-supraoptique semble assez spécifique du cobaye ;
- alors que les péricaryons des neurones de l'hypothalamus médiobasal sont principalement localisés dans le noyau arqué chez le cobaye, chez le rat ils semblent inexistants dans le noyau arqué et sont davantage répartis à la base de l'aire hypothalamique tubérale (KAWANO H. et DAIKOKU S. 1981).
- chez le cobaye, la déconnexion de l'hypothalamus médiobasal ou les lésions de

l'aire préoptique affectent assez peu l'immunoréactivité observée dans l'infundibulum. Chez le rat et la souris, de telles expériences font décroître considérablement les taux de LRF de l'hypothalamus médiobasal (Réf. dans BARRY 1979 a) et le nombre de fibres réactives de l'éminence médiane (SETALO et Coll. 1976) sans qu'il soit probable que ces modifications puissent être attribuées à la suppression de certaines afférences qui semblent plus agir, par exemple chez le rat déshydraté, sur les péricaryons de l'aire préoptique, en augmentant leur réactivité, que sur ceux de l'hypothalamus basal (KRISCH 1978). Ceci suppose, chez ces animaux, une participation plus importante des neurones rostraux au tractus hypothalamo-infundibulaire, que chez le cobaye.

A l'opposé, chez les primates (singe écureuil, homme), il existe particulièrement peu de liaisons axoniques entre l'hypothalamus rostral et l'hypothalamus basal ; la grande majorité des fibres formant le tractus hypothalamo-infundibulaire proviendrait de péricaryons de l'hypothalamus médiobasal (BARRY 1979 a).

- il faut noter que chez le hamster, PICKARD et SILVERMAN (1976) ont observé de nombreux péricaryons à LRF dans l'hypothalamus médian, mais aucun dans les régions plus rostrales.

S'il est néanmoins probable qu'il existe des grands mécanismes de régulation assez semblables dans ces différentes espèces, cette dispersion des neurones à LRF rend les résultats expérimentaux plus complexes et leur interprétation plus délicate.

Il faut souligner que le LRF pourrait avoir plusieurs modes d'action :

1°) déversé dans les capillaires du système porte hypophysaire, il gagne l'antéhypophyse et peut agir sur les cellules gonadotropes (tractus hypothalamo-infundibulaire).

2°) déversé dans les capillaires de l'organe vasculaire de la lame terminale, il entre dans la circulation générale à partir de laquelle on ne connaît pas encore sa finalité, il peut alors également atteindre l'antéhypophyse mais à l'état très dilué ; il peut également gagner l'aire médiane préoptique ou l'aire commissurale rostrale sur lesquelles il pourrait exercer un rétro-contrôle (tractus préoptico-terminal).

3°) il peut aussi être excrété dans le liquide cérébro-spinal interne ou externe.

4°) enfin, il pourrait agir comme un neurotransmetteur ou un neuromodulateur par l'intermédiaire de "synapses neurosécrétoires" semblables à celles décrites par BARRY en 1954 concernant les tractus neurosécrétoires extrahypophysaires GOMORI positifs. En effet, des images de telles synapses ou de terminaisons diffuses d'axones et de collatérales réactives autour de neurones non réactifs ont été observées par BARRY et Coll. 1973 c, surtout dans la crête supra-optique, le ganglion médian habénulaire, le noyau thalamique dorsomédian et le ganglion interpédonculaire. Certaines de ces synapses sembleraient être de type axosomatique formant des dispositifs en "corbeilles péricellulaires".

Les neurones à LRF, et plus spécialement ceux des tractus extra-hypothalamiques, joueraient un rôle dans le contrôle du comportement sexuel; en effet, chez le rat, l'aire préoptique est impliquée dans le comportement sexuel du mâle (HEIMER et LARSSON 1967, réf. dans PFAFF 1978), alors que l'hypothalamus médiobasal et le mésencéphale sont impliqués dans le contrôle du comportement sexuel femelle (réf. dans PFAFF 1978). Chez le lapin femelle, la majorité des fibres réactives avec des anti-LRF deviennent invisibles après copulation (SETALO et Coll. 1978). Or, chez le singe écureuil, (BARRY 1979 a) a noté que les tractus septo-épithalamo-habénulaires étaient davantage visibles durant l'été, période de faible activité sexuelle. Chez l'homme, le LRF semble avoir également des effets sur le comportement sexuel (Réf. dans MOSS 1978).

La sécrétion tonique de LH semble être contrôlée par les neurones de l'hypothalamus médiobasal. En effet, chez le cobaye, des lésions du noyau arqué provoquent une diminution marquée des taux de la LH basale chez le mâle, ainsi qu'une atténuation sévère du pic de LH de postcastration chez les femelles, ceci sans qu'il y ait nécrose de la glande pituitaire et avant toute augmentation de poids des glandes surrénales (KREY et SILVERMAN 1978). Des lésions du noyau arqué ont produit les mêmes effets sur la sécrétion tonique de LH chez le rat et le singe Rhésus (CHEUNG et DAVIDSON 1977 ; PIACZEK et HOFSTETTER 1977 ; PLANT et Coll. 1978). Parmi les neurones du tractus hypothalamo-infundibulaire, seuls les neurones tubéro-infundibulaires semblent jouer un rôle prépondérant sur la sécrétion tonique de LH ; en effet, des lésions de l'aire préoptique ou du noyau supra-chiasmatique ne provoquent pas les effets obtenus par la destruction du noyau arqué sur la sécrétion de LH chez le cobaye mâle ou sur le pic de postcastration chez le cobaye femelle (KREY et SILVERMAN 1978). De plus, en accord avec les résultats de

HALASZ et GORSKI 1967 chez le rat, la déconnexion de l'hypothalamus chez le cobaye (BUTLER et DONOVAN 1971) ou chez le singe (KREY et Coll. 1975) n'influence pas la sécrétion tonique des gonadotrophines.

L'identité des neurones à LRF responsables du contrôle de la sécrétion cyclique de la LH est beaucoup plus discutée et encore incertaine ; il semblerait que soient concernés par ce rôle physiologique, essentiellement les neurones du tractus préoptico-terminal ainsi que les neurones de la région rostrale qui envoient leurs axones vers l'éminence médiane. Les résultats expérimentaux sont assez contradictoires ; en effet chez le cobaye, dans l'expérience de TERASAWA et WIEGAND 1978, la section des tractus préoptico-infundibulaires n'a pas empêché les pics préovulatoires de gonadotrophines de se produire et chez le singe Rhésus, l'isolement de l'hypothalamus médiobasal n'a eu que très peu d'effet sur cette cession cyclique et sur l'ovulation (KNOBIL 1974, KREY et Coll. 1975). En revanche, chez le rat (HALASZ et GORSKI 1967) et le hamster (NORMAN et Coll. 1972), celui-ci provoque un blocage permanent de l'ovulation.

De plus, chez le rat (SAMSON et Mc CANN 1979 a-b), des lésions de l'OVLT ou du noyau suprachiasmatique bloquent totalement la décharge des gonadotrophines induite par la progestérone (sans affecter la sécrétion tonique de LH et de FSH) et provoquent une diminution du LRF dans l'éminence médiane. De même, la déafférentation de l'hypothalamus chez la brebis ovariectomisée supprime l'induction de la décharge de LH produite normalement par l'oestradiol (JACKSON et Coll. 1978).

Chez le singe écureuil, au cours du cycle oestral, BARRY (1979 b) a observé des modifications périodiques du tractus préoptico-terminal à LRF et chez le rat, WENGER et LEONARDELLI 1980 ont constaté des variations cycliques du contenu en LRF de l'OVLT ainsi que du nombre et du diamètre des vésicules granuleuses dans les terminaisons nerveuses de cette région.

Les contradictions expérimentales peuvent résulter de la complexité des systèmes de régulation, néanmoins, s'il apparaît assez nettement chez le rat, que ce sont les groupes de neurones rostraux qui sont principalement impliqués dans le contrôle de la sécrétion cyclique de la LH (et donc de l'ovulation), chez le cobaye, ces derniers ne semblent curieusement pas jouer un tel rôle.

Nous nous sommes donc proposé d'essayer d'étudier l'importance qu'ils pouvaient avoir dans le phénomène de l'ovulation.

Les neurones à LRF reçoivent de nombreuses afférences qui modulent leur activité, ainsi :

- parmi les catécholamines, l'action de la dopamine est très discutée ; elle pourrait être double : facilitante par son action sur des récepteurs inhibés par l'halopéridol et inhibitrice par son action sur ceux inhibés par le pimozide ou le dompéridone (SARKAR et FINK 1981).
  Il pourrait exister des interactions de type axo-axonique entre les nombreuses terminaisons des neurones à LRF et des neurones à dopamine dans l'éminence médiane, certains de ces neurones monoaminergiques stimulant ainsi la cession du LRF dans les vaisseaux du système porte hypophysaire (KAMBERI et Coll. 1969, LEONARDELLI 1971).
  La norépinéphrine (noradrénaline), par l'intermédiaire de récepteurs α-adrénergiques, stimule la décharge préovulatoire de LH (SAWYER et Coll. 1947, SAWYER 1952, RANCE et Coll. 1981).

- la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) augmente le contenu en LRF des neurones (LEONARDELLI et Coll. 1974) et simultanément peut, soit inhiber la sécrétion de LH (LEONARDELLI et CROIX 1977, KAMBERI et coll. 1970), soit l'augmenter (PORTER et Coll. 1971/72). Elle bloque l'ovulation (O'STEEN 1965, KORDON et GLOWINSKI 1972).

- l'acétylcholine provoque, par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques, une activation des neurones à LRF.

- les neurones sécrétant des neuropeptides à activité morphinomimétique tels les enképhalines, ont un effet inhibiteur sur les neurones à LRF. En effet ils bloquent la décharge préovulatoire de LH ; leur action peut être anéantie par la naloxone et également par l'injection de LRF (KÖVES et Coll. 1981) ; ils agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques aux opiacés. Des terminaisons nerveuses de ces neurones ont été mises en évidence dans l'éminence médiane chez le rat (HÖKFELT et Coll. 1978) et chez le cobaye (TRAMU et LEONARDELLI 1979, BEAUVILLAIN et Coll. 1980, TRAMU et Coll. 1981).

Les récepteurs sur lesquels agissent toutes ces substances se situeraient soit directement sur les neurones à LRF, soit sur des interneurones.

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 chez les Rongeurs (KATO et VILLEE 1967, STUMPF 1968, 1971, WAREMBOURG 1970, PFAFF et KEINER 1973) ; en revanche, chez les Primates, la plupart des sites oestrogéno-sensibles sont localisés dans l'hypothalamus médiobasal (FERIN et Coll. 1974), ceci est peut-être en relation avec la différence de répartition des neurones à LRF. Des récepteurs d'oestradiol ont également 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).

De nombreux travaux tels ceux de FLERKO 1957 a-b, FLERKO et BARDOS 1960, 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 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) étaient en accord avec l'hypothèse de FLERKO et SZENTAGOTHAI 1957 : 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).

Comme l'ont suggéré BARRACLOUGH et GORSKI en 1961, alors que la région tubérienne serait responsable d'une sécrétion tonique de base de la LH et serait 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) 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, BLAKE et Coll. 1974) et, dans un second temps, un accroissement de cette sensibilité (DEBELJUK et Coll. 1972), ainsi qu'une augmentation très nette des taux de LH sérique, ceux de FSH n'augmentant que plus modérément.

Un effet inhibiteur des oestrogènes sur l'aptitude de la glande pituitaire à répondre au LRF a été montré par FRAWLEY et Coll. 1981 chez des singes Rhésus dont la tige hypophysaire a été sectionnée ; en effet ces animaux, une semaine après opération (taux de stéroïdes ovariens bas) répondent à une injection de LRF (20 µg) par une sécrétion de LH 10 fois plus importante que s'ils ont été traités aux oestrogènes après l'opération afin de rétablir les taux d'oestradiol circulants de la phase folliculaire, ou que les animaux normaux.

Chez le rat ovariectomisé, si l'oestrogène est administré après le début de la sécrétion de LH induite par le LRF, le stéroïde supprime la décharge de LH (LIBERTUN et Coll. 1974, SCHUILING et GNODDE 1977) ; s'il est administré avant le commencement d'une exposition au LRF, il provoque tout d'abord une diminution de la sensibilité de l'hypophyse au LRF, suivie d'une augmentation importante (LIBERTUN et Coll. 1974, SCHUILING et GNODDE 1976, 1977).

Ce double effet sur la sécrétion de LH obtenu par l'administration d'oestradiol, est également observé chez des singes Rhésus ovariectomisés, dont la production de LRF endogène a été supprimée par des lésions hypothalamiques, et placés sous une infusion chronique intermittente (intra-ventriculaire cérébrale) de LRF synthétique (1 µg/min. pendant 6 minutes toutes les heures) (NAKAI et Coll. 1978).

Il se pourrait qu'une telle action biphasique de l'oestradiol se produise au cours du cycle oestral normal.

Il faut remarquer que l'oestradiol peut encore avoir une action positive sur la sécrétion de LH par l'hypophyse lorsqu'il est administré 8 heures après la section de la tige pituitaire chez les singes Rhésus (FERIN et Coll. 1979) ou 24 heures (et même 48 heures, mais avec une efficacité réduite) après qu'ait cessé l'infusion de LRF chez des singes Rhésus ovariectomisés et dont la sécrétion de LRF endogène a été supprimée (WILDT et Coll. 1981).

Outre une première action inhibitrice sur la sécrétion de LH,

l'oestradiol a donc, sur l'hypophyse, une action stimulante qui est capable de s'exercer relativement longtemps après que le LRF ait disparu de la circulation.

Toutefois, il est démontré que le facteur déterminant le moment du pic préovulatoire de LH se situe au niveau du contrôle de la sécrétion du LRF et non de la capacité à répondre de l'hypophyse ; en effet, KESNER et Coll. 1981 ont montré, chez les bovins, que la glande pituitaire était aussi apte à répondre au LRF 5 à 15 heures avant le pic préovulatoire de LH qu'au moment de ce pic.

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).

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 α-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, WEISSMAN et SKOLNICK 1975). L'injection d'AMP cyclique dans le troisième 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.

En ce qui concerne l'action de l'oestradiol au niveau du système nerveux central sur le déclenchement de la décharge préovulatoire de LH, l'hypothèse d'une rétroaction positive de cet oestradiol, plutôt que celle de la levée (au moment de la chute des taux sanguins) d'une inhibition produite par un rétrocontrôle négatif, peut être retenue par le fait que, chez le rat, (LEGAN et KARSCH 1973), le mouton (GODING et Coll. 1969) et le singe (KARSCH et Coll. 1973), la décharge de LH peut être amorcée avant qu'il n'y ait eu une diminution des taux d'oestrogènes.

La progestérone a une action inhibitrice sur la sécrétion tonique de la LH ; cette action s'exerce au niveau de l'hypothalamus médiobasal chez le rat. Elle aurait une double action sur la sécrétion cyclique de la LH, facilitante au niveau de l'antéhypophyse, inhibitrice au niveau du système nerveux central.

L'activité de l'axe gonadotrope est également en relation avec l'activité de l'axe corticotrope.

En effet, il a été montré que l'ACTH inhibe la maturation sexuelle ainsi que la sécrétion de LH (CHRISTIAN 1971, COHEN et MANN 1979, OGLE 1977).

Bien qu'encore capables d'une décharge de LH et d'une ovulation après adrénalectomie, les rates présentent alors des cycles irréguliers (BALDWIN et SAWYER 1979, FEDER et Coll. 1971, MANN et Coll. 1975) ; ceci serait dû à la disparition du rythme de la corticostérone (RAMALEY 1975). Chez le rat, il a nettement été montré une augmentation des taux de corticostérone en pro-oestrus (RAPS et Coll. 1971, PHILLIPS et POOLSANGUAN 1978) ; mais aussi de l'ACTH (BUCKINGHAM et Coll. 1978) ; en fait, en dehors de cet auteur, chez le rat, aucune étude détaillée n'a été faite sur les variations de l'ACTH en rapport avec l'ovulation ; de plus, des modifications importantes, comme celles qui existent chez le rat, n'ont, à notre connaissance, pas été mises en évidence chez la femme.

Pour certains auteurs, l'augmentation lente de la progestérone plasmatique précédant la décharge préovulatoire de LH serait d'origine surrénalienne et aurait un effet facilitant sur cette décharge (FEDER et Coll. 1971, LAWTON 1972 : retard ou absence du pic préovulatoire de LH chez les animaux adrénalectomisés ; HOLZBAUER et Coll. 1969, HOLZBAUER et GODDEN 1974 : augmentation de la progestérone dans la glande et dans le sang de la veine surrénalienne en pro-oestrus).

En outre, les corticostéroïdes augmentent la sensibilité de l'ovaire aux gonadotrophines (MANDL 1954, RAMALEY 1973, RAMALEY et BARTOSIK 1975).

L'injection de corticostérone à des rates adrénalectomisées provoque une augmentation de l'amplitude de la sécrétion de la LH en réponse à une administration de LRF (avec un maximum 6 heures après l'injection de corticostérone) ainsi qu'une augmentation de la vitesse de dégradation de la LH dans le sang ; mais l'heure de l'injection de cette corticostérone n'est pas indifférente (inefficace à 5 h ; efficace à 17 h), même chez des animaux gardés en illumination constante (COHEN et MANN 1981). Etant donné, en outre, que la corticostérone seule n'a pas d'effet sur la sécrétion de LH par des cellules antéhypophysaires en culture mais augmente leur réponse au LRF (FUJIHARA et SHIINO 1980), COHEN et MANN (1981) pensent que la corticostérone injectée aux animaux adrénalectomisés agit en prévenant la montée de prolactine (or l'hyperprolactinémie inhibe la sécrétion

basale de LH et la réponse au LRF, MINAGUCHI et MEITES 1967, LU et Coll. 1976, SMITH 1978, WINTERS et LORIAUX 1978, GREELEY et KIZER 1979), ainsi que la sécrétion de l'ACTH, qui suivent l'adrénalectomie.

Nous nous sommes proposé d'étudier l'activité des axes gonadotrope et corticotrope au cours du cycle oestral, et principalement dans la période périovulatoire, chez le cobaye et le singe écureuil, par une analyse comparée :

- des variations des taux du LRF dans différentes zones hypothalamiques (notamment hypothalamus antérieur et OVLT, hypothalamus médiobasal et éminence médiane)

- des variations des taux des gonadotrophines hypophysaires et sériques, du 17 β oestradiol et de la progestérone

- de l'ACTH et du cortisol plasmatiques.

Pour cela, il nous a été nécessaire de mettre au point :

- les dosages radio-immunologiques des gonadotrophines de cobaye (et dans un premier temps la préparation de fractions partiellement purifiées de FSH et de LH hypophysaires de cobaye)

- les dosages radio-immunologiques des gonadotrophines de singe écureuil

- le dosage radio-immunologique du LRF tissulaire.

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

I - RECHERCHE DE SYSTEMES PERMETTANT LES DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DES GONADOTROPHINES DE COBAYE ET DE SINGE ECUREUIL

A - 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), associées par des interactions non covalentes ; cette hormone a un pHi voisin de 4,5 (PAPKOFF et Coll. 1967, CAHILL et Coll. 1968, SHERWOOD et Coll. 1970) ; RYSZKA et Coll. 1971 ont pu mettre en évidence, par dicroïsme circulaire, une configuration en hélice α qui pourrait intéresser jusqu'à 30 p. 100 des acides aminés (EKBLAD et Coll. 1970).

La FSH humaine (BUTT et LYNCH 1972) 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, STOCKELL-HARTREE 1972) ; elle est également formée de deux sous-unités (α = 96 AA, β = 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, DE LA LLOSA et Coll. 1967, 1969), mais aucune hélicité n'a été trouvée (JIRGENSONS 1960). La partie glucidique, qui intervient pour 15 à 40 p. 100 dans la composition de la molécule (PAPKOFF 1966), 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, 1961, modifiée par STOCKELL-HARTREE 1966, 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, qui s'effectue dans un premier temps par une série de fractionnements au sulfate d'ammonium.

1 - Méthode par chromatographies sur échangeurs d'ions (Tableau I p. 25)

a) Poudre acétonique :

Nous avons prélevé deux lots de 300 et 500 antéhypophyses sur des cobayes âgés de 10 à 30 jours (âge pour lequel BROWN 1971 a montré que les taux de FSH dans la glande pituitaire étaient très importants), ainsi qu'un lot de 150 préhypophyses sur des cobayes adultes mâles castrés. Ces antéhypophyses ont été conservées 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 antéhypophyses sont homogénéisées au POTTER-ELVEHJEM, dans l'acétone ; après décantation, le surnageant est enlevé ; l'opération est répétée trois fois pour obtenir une bonne délipidation.

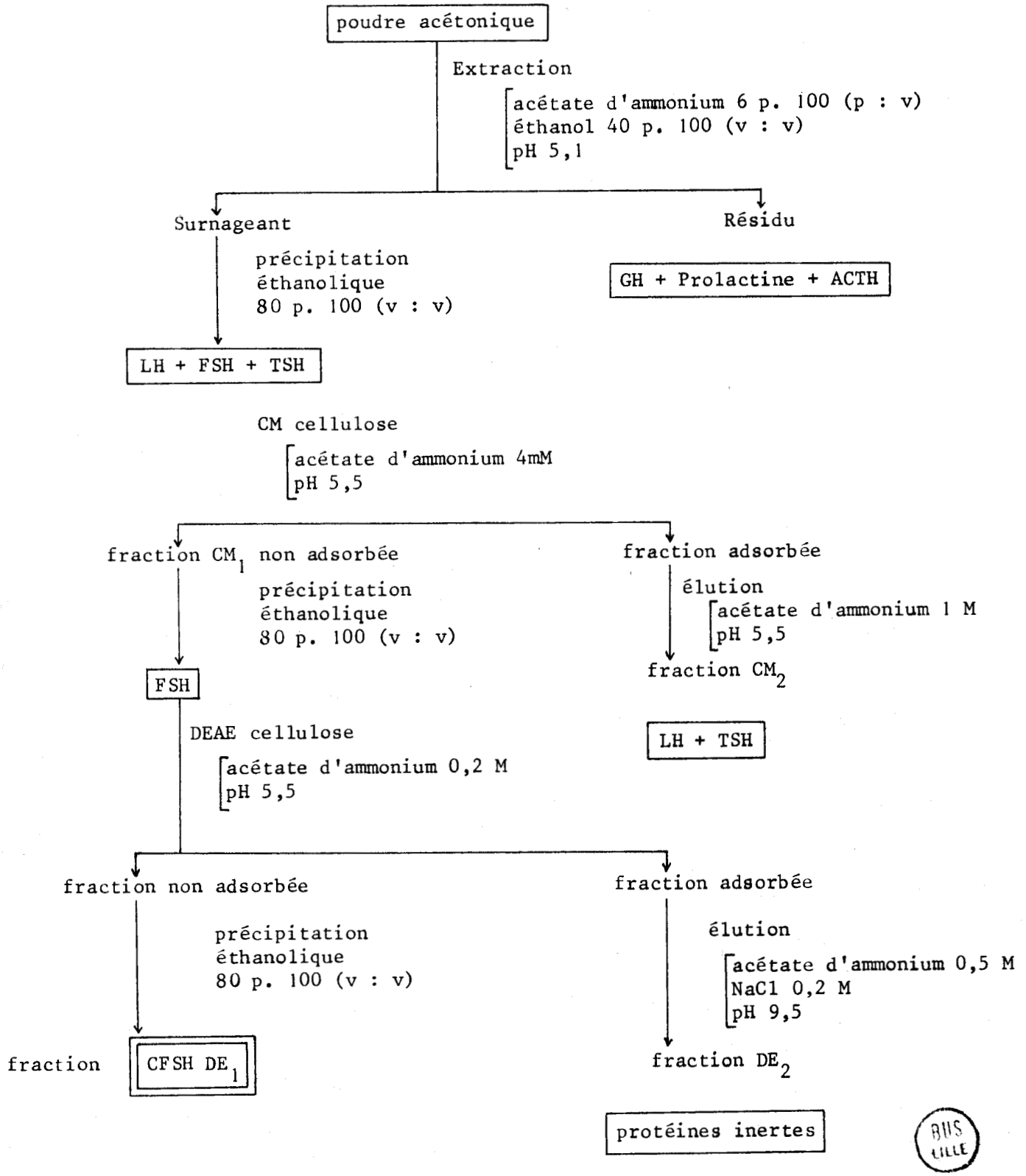
b) Extraction des glycoprotéines : (Procédé de STEELMAN et Coll. 1958, modifié par BUTT et Coll. 1961)

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 amenée 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

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



BUS LILLE

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.

c) 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 activée 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.

d) 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 solution HCl 0,5 N, NaOH 0,5 N suivis chacun par des rinçages à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

La fraction CDE_1FSH 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

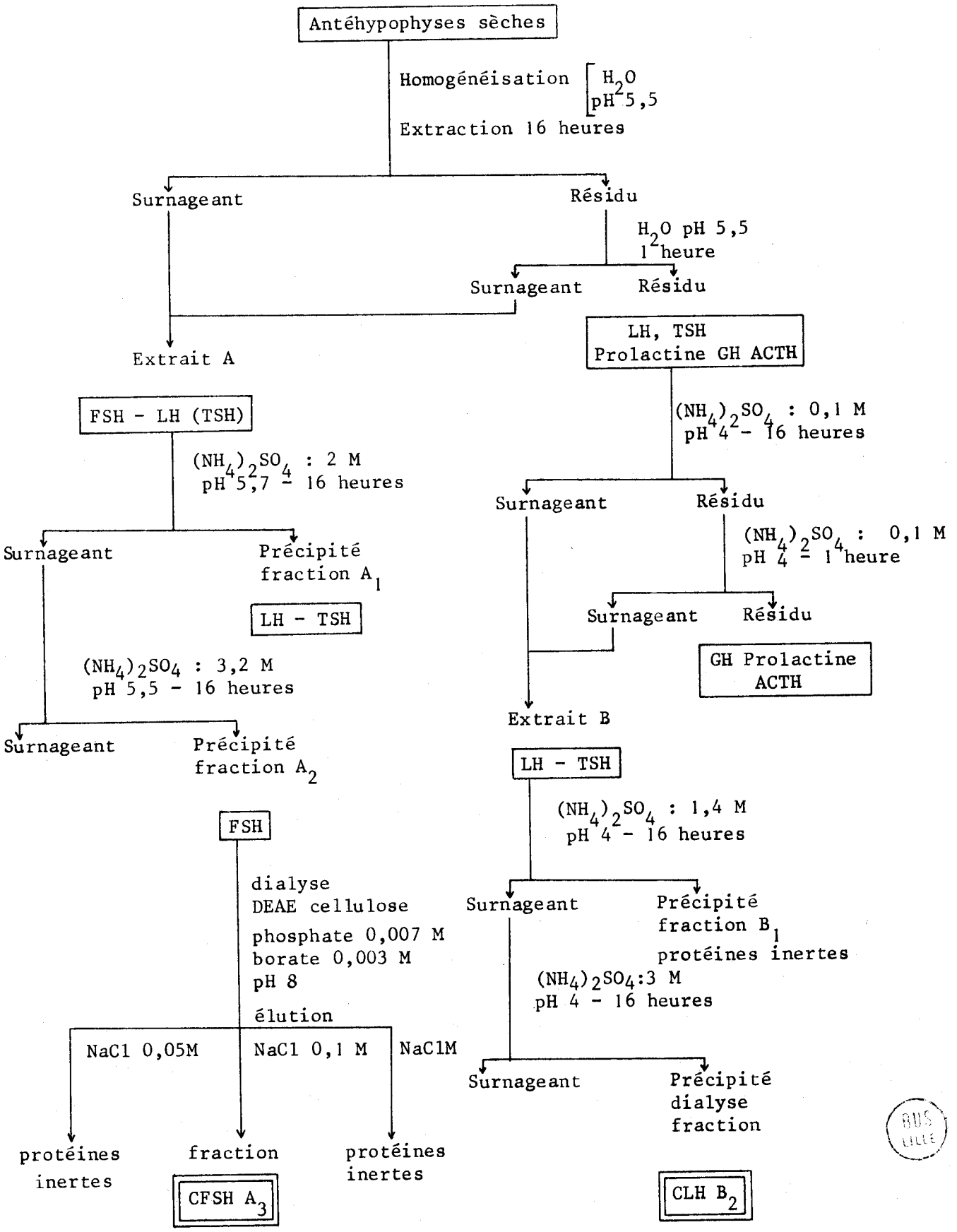
et constituent la fraction DE_2.

2 - Méthode d'extraction et de fractionnement au sulfate d'ammonium (Tableau II p. 28)

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.



a) 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_1). 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_2). 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_2PO_4 0,007 M
$Na_2B_4O_7$ 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 éluée par la concentration 0,1 M en NaCl (fraction $CFSHA_3$).

b) 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_1). Après centrifugation, la LH est à son tour précipitée en amenant le nouveau surnageant 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 $CLHB_2$).

B - 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.

1) Préparations hormonales utilisées

a) Pour le marquage :

Ces préparations proviennent soit du National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health - Bethesda - Maryland - U.S.A., soit de Calbiochem - La Jolla - Californie - U.S.A.

Il s'agit de :

- la NIAMD rat FSH I_1 possédant une activité biologique de 100 unités NIH FSH S_1/mg selon le test d'augmentation du poids des ovaires de rates immatures saturées d'hormone chorionique gonadotrope : test de STEELMAN et POHLEY 1953, et une contamination en LH évaluée à un taux inférieur à 0,002 unité NIH LH S_1/mg par la mesure de la déplétion ovarienne en acide ascorbique chez des rates en pseudogestation (OAAD) : test de PARLOW 1961.
- la NIAMD rat LH I_1 dont l'activité biologique est de une unité NIH LH S_1/mg, la contamination en FSH inférieure à 0,04 NIH FSH S_1/mg et celle en TSH, de 0,4 USP U/mg (test de Mc KENZIE 1968).
- la LH ovine (référence 438 515 de Calbiochem), dont l'activité biologique est de 2,0 unités NIH LH S_1/mg, la contamination en FSH inférieure à 0,1 unité NIH FSH S_1/mg et celle en TSH inférieure à 0,1 U.I./mg.

- la FSH humaine purifiée (Référence 869 001 de Calbiochem) dont l'activité biologique est au minimum de 3 500 unités internationales/mg (IRP - HMG), la contamination en LH de 100 U.I./mg et celle en TSH de 0,1 U.I./mg.
- la LH humaine purifiée (Référence 869 003 de Calbiochem), d'activité biologique d'au moins 2 000 U.I./mg ; contamination en FSH inférieure à 4 U.I./mg et en TSH : 0,06 U.I./mg.

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

- la NIAMD rat FSH RP_1 (activité biologique : 2,1 NIH FSH S_1/mg ; contamination en LH : 0,02 NIH LH S_1/mg)
- la FSH ovine NIH FSH S_7 (1,15 NIH FSH S_1/mg ; 0,019 NIH LH S_1/mg)
- la FSH porcine NIH FSH P_1 (0,76 NIH FSH S_1/mg ; 0,0075 NIH LH S_1/mg)
- la NIAMD rat LH RP_1 (activité biologique : 0,03 NIH LH S_1/mg ; contamination en FSH : 0,54 NIH FSH S_1/mg ; en TSH : 0,22 USP U/mg)
- la LH ovine M_3 obtenue par M. JUTISZ (2,55 NIH LH S_1/mg)
- l'αHCG et la βFSH humaines qui nous ont été données par le Docteur R. CANFIELD et le Professeur L.E. REICHERT.
- la préparation Calstan-II™ (Référence 869 025 de Calbiochem) reconstituée de telle sorte qu'elle possède une activité de 320 U.I./ml soit de type FSH, soit de type LH, suivant le dosage
- la HFSH et la HLH (Calbiochem) déjà utilisées pour le marquage.

c) Extraits antéhypophysaires de cobaye ou de singe écureuil :

- des extraits antéhypophysaires de cobaye ou de singe écureuil réalisés soit à partir de la poudre acétonique remise en solution, soit par homogénéisation à 4°C des glandes (qui ont été conservées congelées à - 20°C) directement dans du tampon phosphate, centrifugation et prélèvement du surnageant dont des aliquotes seront introduites dans les dosages.
- les différentes fractions d'extraction des gonadotrophines, préparées à partir des antéhypophyses de cobaye, 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 γ/ml.

2) Antisérums utilisés

- L'antisérum anti FSH ovine préparé chez le lapin par HENDRICK et Coll. 1971 par immunisation contre de la FSH ovine SH 80 820 SHERING selon la méthode décrite par FRANCHIMONT 1964.
  100 µg 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 et DUFY-BARBE et Coll. 1972.
  Dans nos dosages, il est employé à des dilutions finales de :
  1/4000 (immunoadsorption-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.
- Deux antisérums anti-FSH humaine, le premier utilisé à la dilution finale de 1/20.000 ; le second (Référence 869 002 de Calbiochem) préparé chez le lapin, utilisé à la dilution finale de 1/2000.
- L'antisérum anti-LH ovine préparé chez le lapin par immunisation contre de la NIH LH S_{15} (DUFY-BARBE et Coll. 1972). 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.
- Trois antisérums anti LH humaine, utilisés à la dilution finale de 1/4000 et provenant de Calbiochem (Référence 869 004), de l'Institut Pasteur Paris (Réf. 7 9630 A/1) et du C.E.A. Gif-sur-Yvette.

3) Marquage

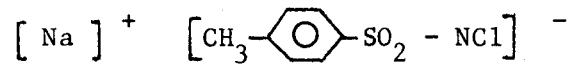
2,5 µg de NIAMD rat FSH I_1, de NIAMD rat LH I_1, de OLH, de HFSH ou de HLH, sont marqués au ^{125}INa (IRE, Mol ; CEA, Gif.sur.Yvette) selon la méthode à la chloramine T de GREENWOOD et Coll. 1963, dont les modalités sont les suivantes :

A 25 µl d'^{125}INa d'activité 1 m Ci sont ajoutés :
- 2,5 µg de l'hormone à marquer dilués dans 25 µl d'eau,

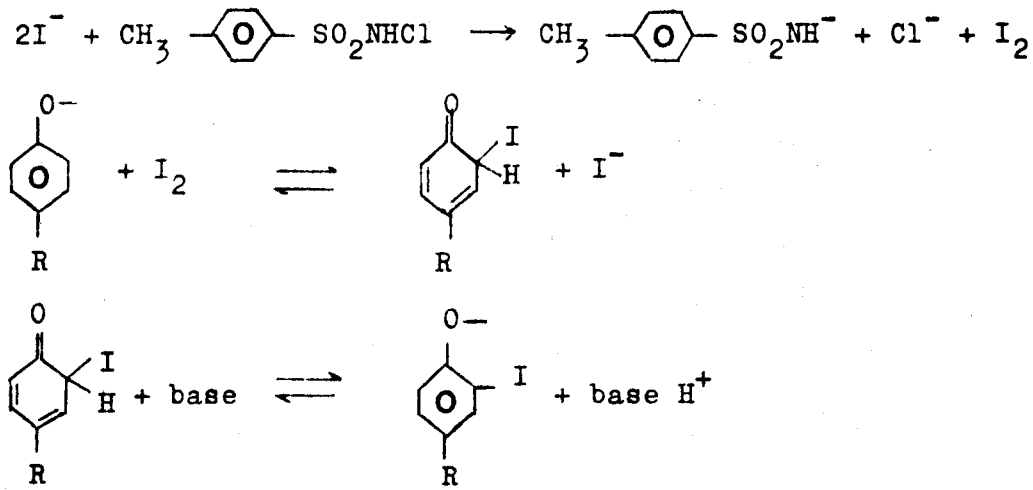
- 25 µl de tampon phosphate 0,5 M. Tampon de SORENSEN de pH 7,5 et de composition :

KH_2PO_4	3,75 g
Na_2HPO_4	38,95 g
H_2O	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 tyronines seraient substitués.



- On laisse s'effectuer la réaction pendant 30 secondes (sous agitation)
- 100 µl de solution réductrice de métabisulfite de sodium (solution à 2,4 mg $Na_2S_2O_5$/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 µl d'une solution d'iodure de potassium (solution à 10 mg KI/ml de tampon 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.H_2O) du :

tampon barbital sodique 0,1 M :

$C_8H_{11}N_2NaO_3$ 20,6 g

H_2O qsp 1 l

12,9 ml sont retirés et remplacés par 12,9 ml HClN

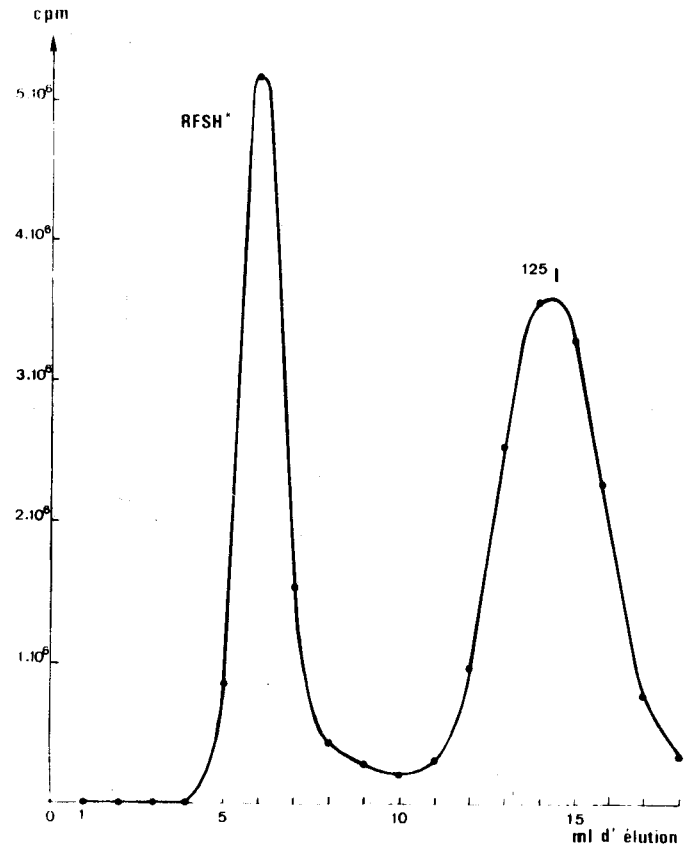
le pH est ajusté à 8,6.

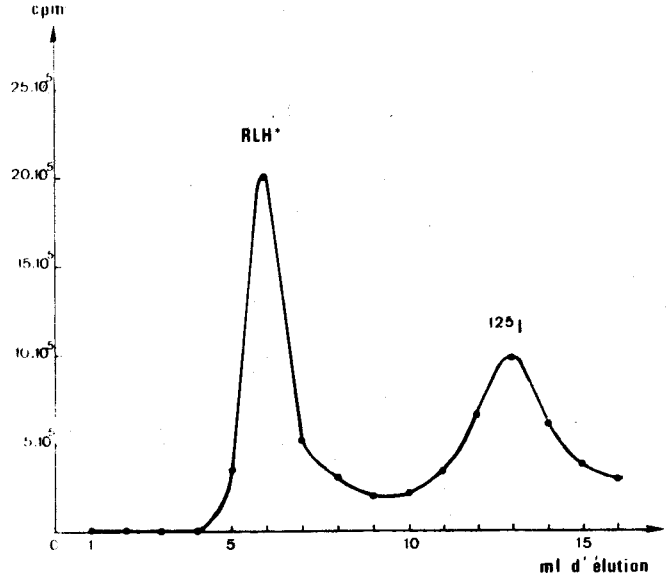
La colonne a été préalablement saturée par le passage de 1 ml de tampon dans lequel ont été dissouts 20 mg d'albumine bovine, puis elle a été rincée par le passage de 20 ml de tampon afin d'éliminer l'albumine en excès.

Le tube où s'est effectuée la réaction de marquage est rincé par 400 µl de la solution d'iodure de potassium. Ces 400 µl 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) ; elle a une activité spécifique de l'ordre de 100 à 200 µCi/µg ; les sels radioactifs libres sont élués plus tardivement avec un maximum aux 13ème ou 14ème fractions (Fig. n° 1, p. 35).





BUS LILLE

Figure n° 1 : Séparation sur Séphadex G 50 de la FSH* (a) ou de la LH* (b), des sels minéraux radioactifs après marquage par l'^{125}I.

4) Techniques de dosages

a) Immunoprécipitation ou technique du "double anticorps" à 4°C :

A 0,4 ml de tampon :

phosphate 0,01 M
NaCl 0,15 M
NaN_3 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 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_3 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.

b) 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, à 1/8000 pour l'anti LH ovine, à 1/500 pour l'anti FSH humaine et à 1/1000 pour l'anti LH humaine, 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 15.000 à 20.000 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.

N.B. : par la suite, le volume de la réaction a été diminué en modifiant les dilutions, ainsi, à l'hormone de référence ou à l'échantillon, furent additionnés :

- 50 µl d'Ac dilué au 1/500 pour l'anti OFSH
  au 1/4000 pour l'anti OLH
  au 1/250 pour l'anti HFSH
  au 1/500 pour l'anti HLH
- 50 µl d'hormone marquée

puis

- 50 µl de sérum de lapin normal dilué au 1/50ème et 50 µl d'antigammaglobulines diluées au 1/5ème.

c) Immunoadsorption :

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).

Les immunoadsorbants utilisés ont été préparés par HENDRICK 1972 selon la technique de WIDE 1969.

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).

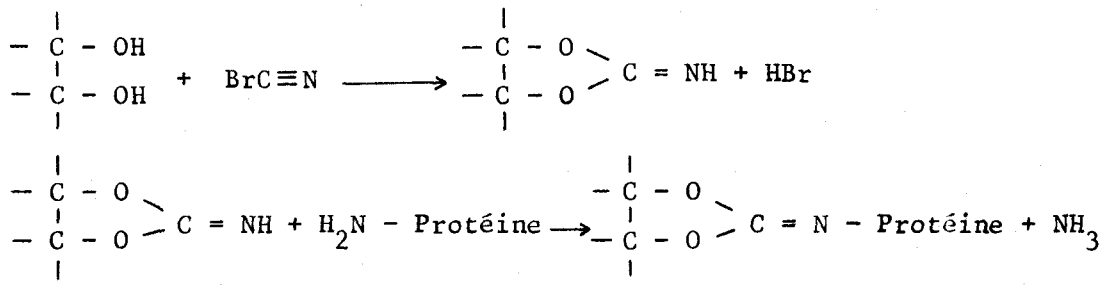
Les antigammaglobulines de lapin sont précipitées à partir du sérum de mouton par addition de Na_2SO_4 (180 mg/ml de sérum). Après agitation pour permettre la dissolution, le mélange est laissé une heure au repos, puis centrifugé 5 mn à 3000 rpm. Le précipité est lavé par une solution de Na_2SO_4 18 p. 100, à nouveau centrifugé et redissout dans 1 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M.

100 µl de gammaglobulines de mouton sont alors mélangés à 200 mg de cellulose activée, ceci dans 1 ml de $NaHCO_3$ 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 $NaHCO_3$ 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°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'immunoadsorbants (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'immunoadsorbant est comptée.

d) Dosage des gonadotrophines dans les sérums de cobayes et de singes

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'additionner 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 ou de singes, plus ou moins riches en hormones, ont été ajoutées (50, 100, 200, 300 et 400 µl) 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 0,2 ml (cobaye) ou 0,3 ml (singe) des différents échantillons de sérums.

Le dosage se déroule de la manière suivante :
dans un premier temps, à 50 µl (ou 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 50 µl (ou 0,1 ml) d'hormone marquée (15 000 - 20 000 cpm) sont ajoutés - Incubation de 24 heures à température ambiante - Les dosages se déroulent ensuite sans autres modifications.

II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17 β-OESTRADIOL

Les deux principaux oestrogènes (17 β-oestradiol et oestrone) sont essentiellement synthétisés par les cellules thécales et interstitielles ou par les cellules folliculeuses de l'ovaire ; la progestérone ovarienne est, elle, essentiellement produite par les cellules lutéales.

La biosynthèse des oestrogènes ovariens s'effectue selon le schéma classique (Tableau III, p. 42) où la progestérone et les androgènes constituent des étapes intermédiaires. Ces transformations nécessitent tout un équipement enzymatique.

La progestérone est également synthétisée par les cellules du cortex surrénalien ; elle constitue alors un métabolite important du cortisol, mais elle est aussi cédée dans le sang.

Nous avons effectué les dosages à l'aide du matériel proposé par le CEA-IRE-SORIN ; la méthode utilisée est celle de l'adsorption de l'hormone libre sur un substrat solide, le charcoal-dextran. (ABRAHAM et Coll. 1971, KUTAS et Coll. 1972, LINDNER et Coll. 1972).

A - DOSAGE DE LA PROGESTERONE

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

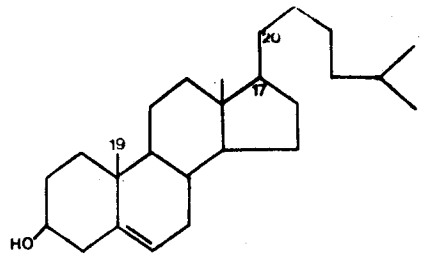
Dans des tubes en verre, à 0,1 ml du sérum à doser de cobaye normal (0,2 ml du sérum de cobaye gestante ou 0,5 ml du sérum de singe) sont ajoutés 3 ml d'hexane. Les tubes sont bouchés avec des capsules de polyéthylène et agités pendant 2 mn avec un agitateur Vortex. Ils sont ensuite centrifugés 5 mn à 200 rpm. 1 ml du liquide d'extraction pour le cobaye normal (0,5 ml pour le cobaye en gestation ou le singe) 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.	

Tableau III : Biosynthèse des oestrogènes ovariens.



Cholestérol

20α-Hydroxycholestérol

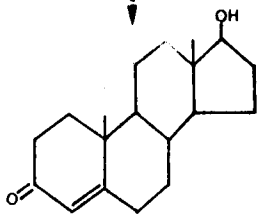
20α-22 Dihydroxycholestérol

Δ5-Prégnénolone

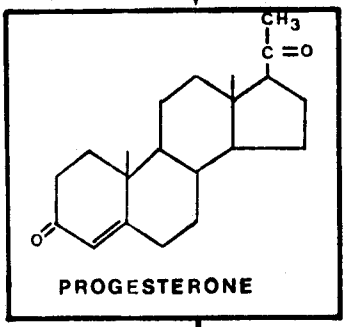
17 Hydroxyprégnénolone

Déhydroépiandrostérone

Androstènediol

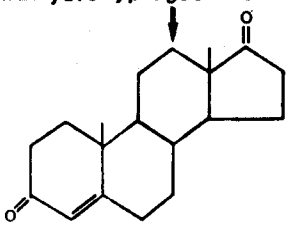


Testostérone



PROGESTERONE

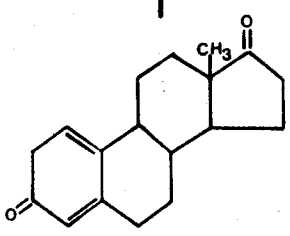
17-Hydroxyprogestérone



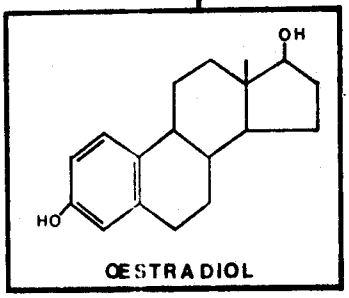
ANDROSTENE-DIONE

19-Hydroxy-androstène-dione

19-Oxo-androstène-dione



OESTRONE



OESTRADIOL

BUS LILLE

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 ressolubilisés dans 0,3 ml de tampon. Parallèlement, une gamme de tubes contenant des solutions de progestérone standard à différentes dilutions est effectuée en triple 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 charcoal-dextran 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, Permablend III - Packard - ou encore, 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 β.

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.

III - DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DU LRF

Le LRF est un décapeptide (Fig n° 2 p. 46) de poids moléculaire 1182,5, de demi-vie 4 à 8 mn. Il ne présente pas de spécificité d'espèce.

Les acides aminés en position 1 et 4 à 10 interviendraient essentiellement dans la conformation de la molécule et dans sa capacité à se fixer sur les récepteurs (et plus particulièrement les acides aminés en position 6 et 10). L'histidine en position 2 et le tryptophane en position 3 seraient responsables de l'activité biologique. Ainsi, par des substitutions, on peut obtenir soit des analogues très actifs : (D - Phe^6) - LH-RH,(D - Trp^6) - LH-RH..., ou, à l'opposé, des inhibiteurs tel le (D - Phe^2, D - Trp^3, D - Phe^6) - LH-RH (SCHALLY 1978).

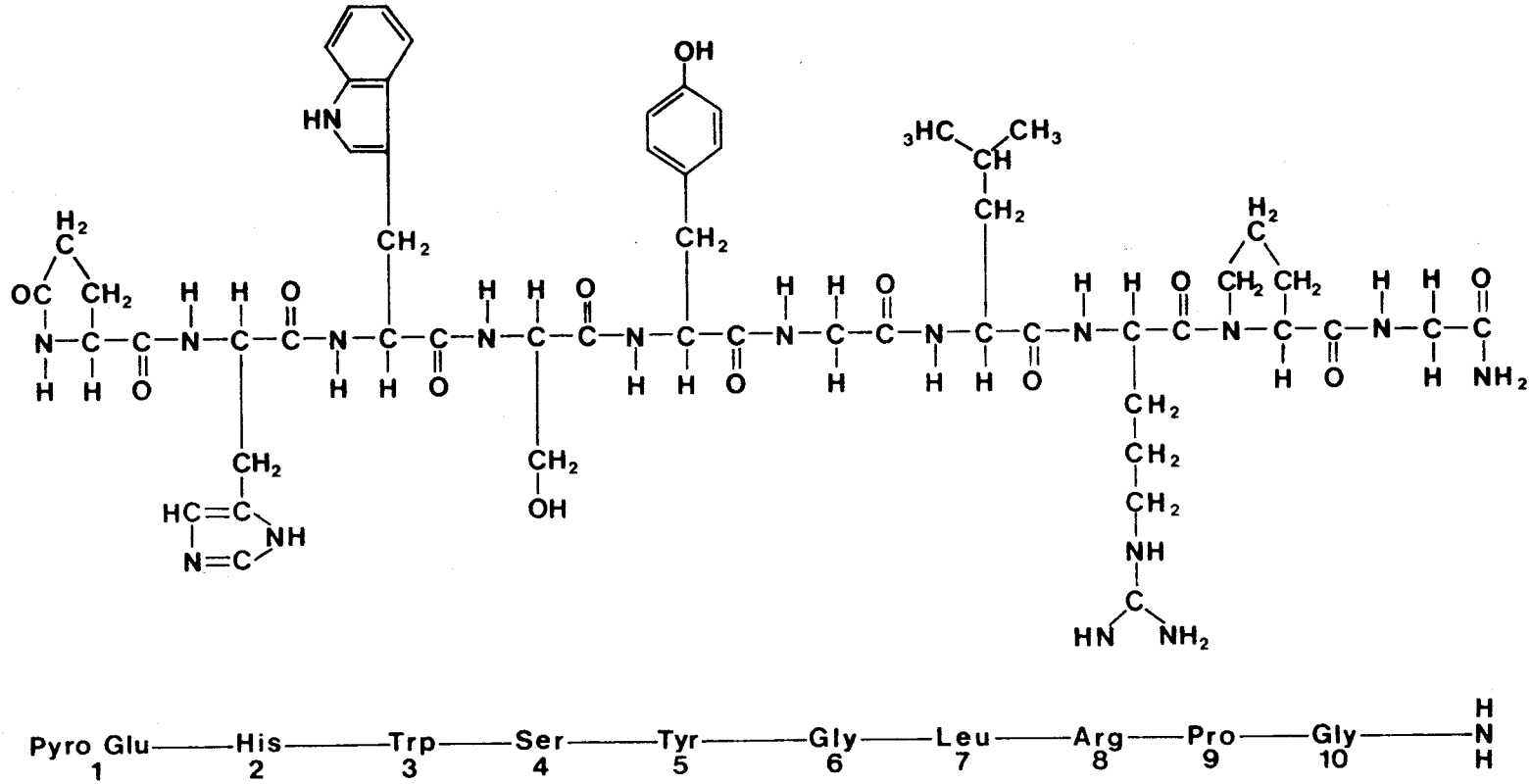


Figure n° 2 : Structure moléculaire du LRF (d'après SCHALLY 1978).

A - Marquage du LRF

1) Réaction :

Sont additionnés :
- 25 µl d'^{125}INa (850 µCi)
- 5 µg de LRF (SERVA) dans 10 µl de tampon phosphate 0,05 M
- 25 µl de tampon phosphate de SORENSEN 0,5 M, pH 7,5
- 30 µg de chloramine T dans 25 µl de tampon phosphate 0,05 M
  temps de réaction : 20 s avec agitation
- arrêt de la réaction par 80 µg de métabisulfite de sodium dans 25 µl de tampon phosphate 0,05 M
- dilution puis rinçages de la fiole de réaction par une solution d'iodure de potassium (10 mg KI/ml de tampon PO_4 0,05 M), 3 fois 50 µl.

2) Chromatographie :

a - soit sur une colonne de Séphadex G 25 (38 cm x 1 cm), 8 à 10 g de gel. Elution (20 ml/h) par une solution :

CH_3 COOH 0,01 M
gélatine 1 p. 1000

les sels radio-actifs libres sont alors élués en premier (fractions 35 - 38), le LRF marqué est élué plus tardivement (maximum aux fractions 60 - 65).(Fig. n° 3, p. 48)

L'inconvénient de cette méthode est de ne pas pouvoir séparer convenablement LRF froid (maximum aux fractions 50-56), LRF monoiodé et LRF diiodé. Une électrophorèse serait alors nécessaire.

b - soit sur une colonne de QAE - Séphadex A 25 (16 cm x 1 cm ; 3 g de gel), équilibrée dans le tampon borate 0,1 M, de pH 9,2 :

H_3BO_3 0,2 M 4 ml
$Na_2B_4O_7$, 10 H_2O 0,05 M 16 ml
gélatine 1 p. 1000

Cette méthode est une adaptation de celle décrite par NETT et ADAMS 1977. Ces auteurs, par une étude détaillée, à partir de davantage de matériel et sur une colonne plus importante, ont montré que la chromatographie sur cette résine échangeuse d'anions permettait la séparation du LRF froid, du LRF monoiodé et du LRF diiodé en raison

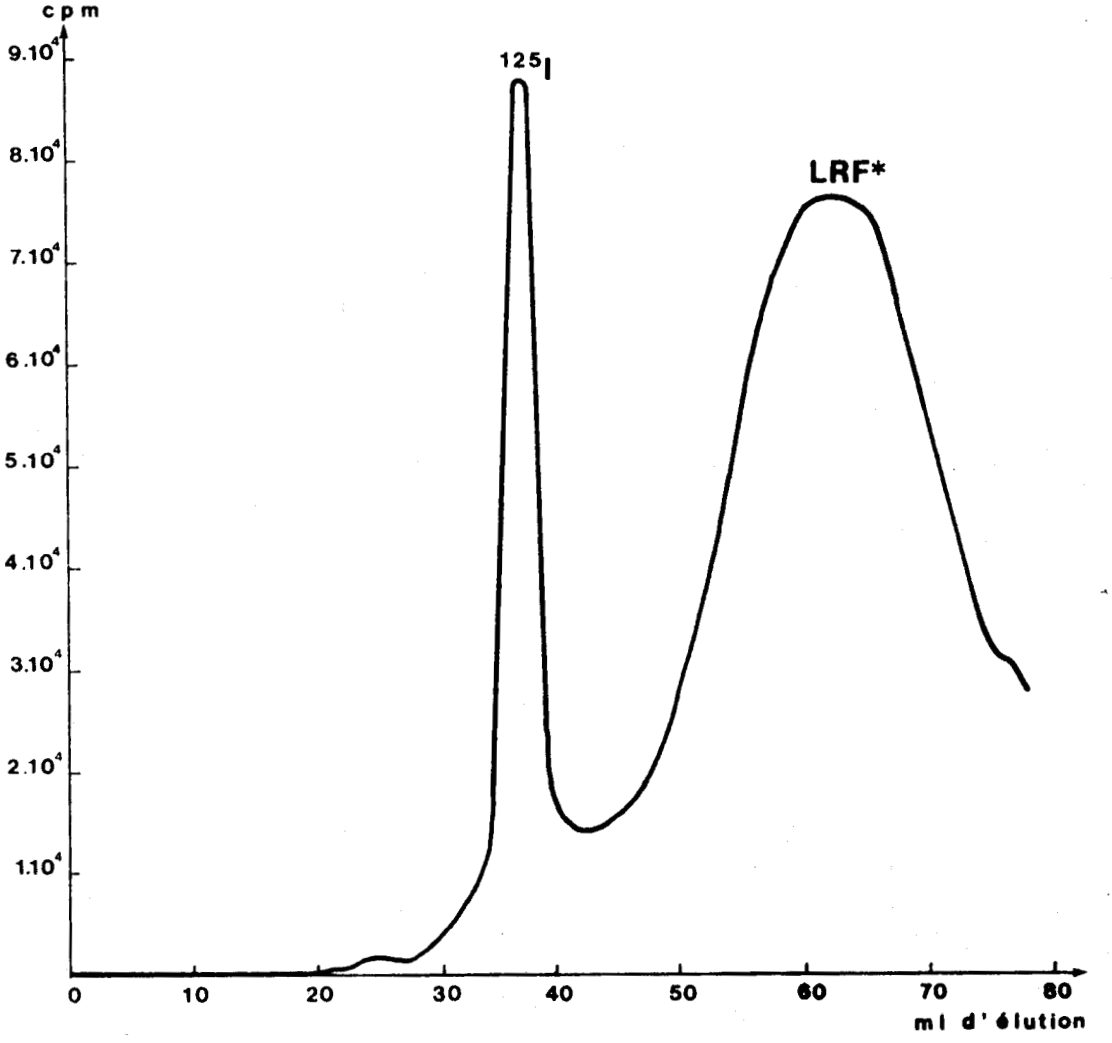


Figure n° 3 : Séparation sur Séphadex G 25 du LRF* et des sels minéraux radioactifs après marquage par l'^{125}I.

SUS LILLE

des différentes valeurs du pK du groupement hydroxyl tyrosyl de ces trois molécules. Les ions iodures libres ne sont pas élués de la colonne.
Sur une colonne de dimensions plus réduites, adaptée aux marquages, le pouvoir de séparation est, bien sûr, moins bon, néanmoins le maximum de radioactivité se situe dans les fractions 19 à 22 (fig. n° 4, p. 50), correspondant au maximum d'élution du LRF monoiodé, fractions qui seront reprises pour les dosages. Le LRF froid est élué plus rapidement (fractions 10 - 12) alors que le LRF diiodé est davantage retenu (maximum d'élution vers les fractions 30 - 35). Les différences de migrations sont suffisantes pour récolter quelques fractions de LRF monoiodé très peu contaminé.
Un antisérum anti LRF (BARRY, n° 44-7), utilisé à la dilution finale de 1/3200, fixe 87 p. 100 de ce LRF marqué.

C'est cette méthode que nous avons finalement adoptée car elle est simple et il est plus exact, dans la mesure du possible, de n'utiliser que du LRF monoiodé pour les dosages.

En effet, le marquage à l'iode par la méthode à la chloramine T, si elle permet une bonne incorporation de l'iode radioactif (au moins double comparée à la méthode à la lactopéroxidase décrite par MORRISON et BAYSE 1970), modifie cependant la molécule de LRF qui peut alors avoir tendance à s'associer de façon non spécifique à des composants macromoléculaires du sérum ou des extraits tissulaires ; ces composants macromoléculaires rentrent alors en compétition avec l'antisérum pour se fixer à l'hormone marquée, laissant davantage d'anticorps libres de se fixer à l'hormone froide, ce qui conduit à une surestimation des valeurs de cette dernière. Or, cette modification est nettement plus marquée pour l'hormone diiodée que pour l'hormone monoiodée.

Les fractions sélectionnées sont additionnées d'un volume égal de tampon de dosage et gardées congelées.

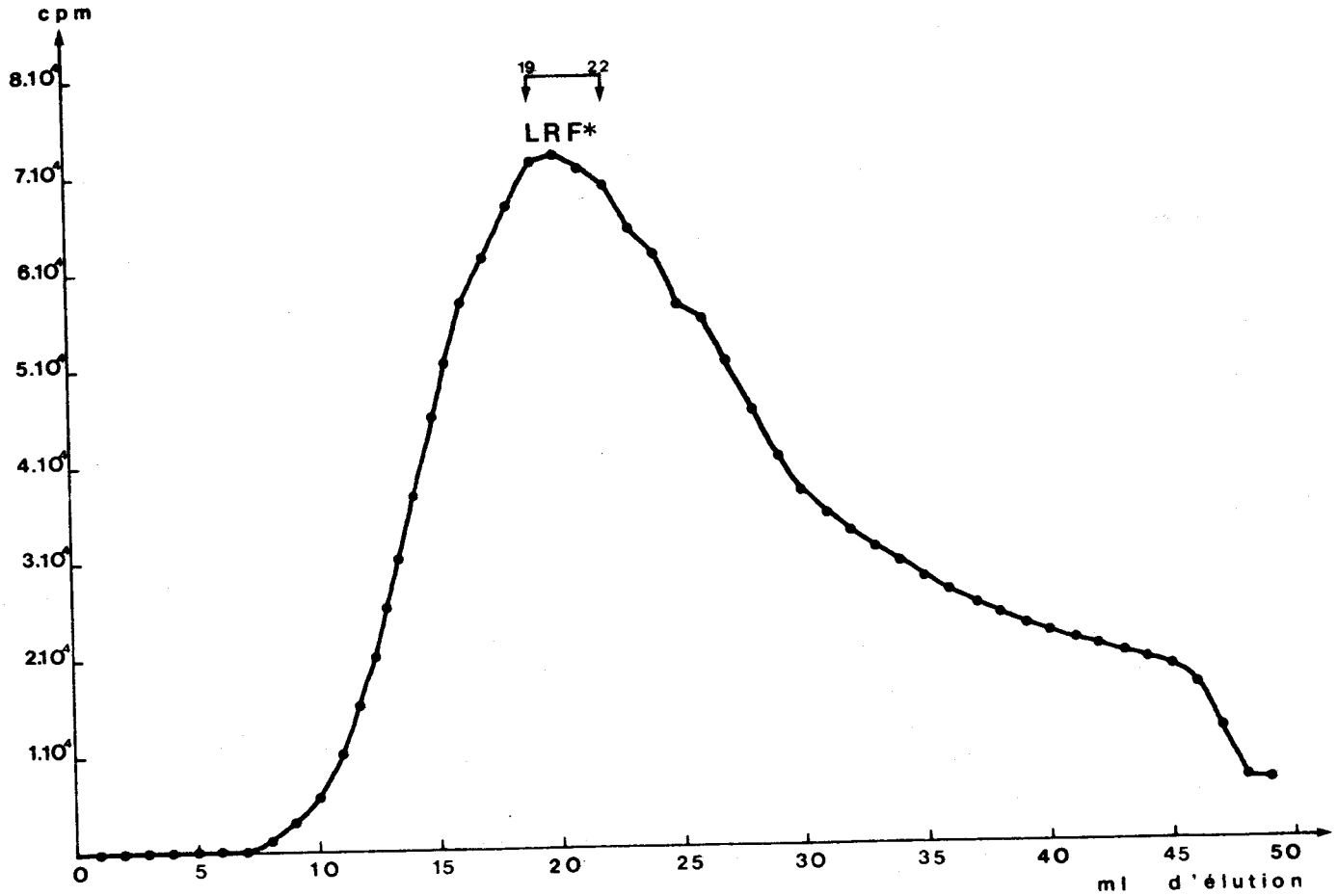


Figure n° 4 : Chromatographie sur QAE-Séphadex A 25 du LRF* après marquage par l'^{125}I.

BIUS LILLE

B - Extraits tissulaires (hypothalamiques et post-hypophysaires)

Les animaux décapités, les cerveaux sont prélevés et refroidis quelques minutes sur une plaque réfrigérante afin d'en faciliter la dissection.

Sont prélevés les fragments correspondant aux zones suivantes :

chez le cobaye (planche V a, p. 52)

n° 1 : zone paraolfactive

n° 2 : organe vasculaire de la lame terminale, zone préoptique et suprachiasmatique

n° 3 : hypothalamus médiobasal et tige infundibulaire (disséquée avec soin à l'aide de micro-ciseaux de PASCHEFF-WOLFF)

n° 4 : mésencéphale

n° 5 : antéhypophyse

n° 6 : lobe nerveux de l'hypophyse (et lobe intermédiaire)

chez le singe écureuil (planche V b, p. 52)

n° 1 : OVLT et zone préoptique

n° 2 : hypothalamus médiobasal et tige infundibulaire

n° 3 : posthypophyse

n° 4 : mésencéphale

n° 5 : antéhypophyse

n° 6 : ganglions habénulaires

Les fragments 5 correspondant aux adénohypophyses sont mis à part et conservés congelés à - 20°C en vue des dosages de la FSH et de la LH.

Les autres fragments sont gardés congelés dans 0,1 ml d'HCl 0,1 N. Au moment du dosage ils sont homogénéisés dans un volume total de 0,5 ml d'HCl 0,1 N, neutralisés par NaOH 1 N, complétés à 1 ml par du tampon de dosage. Après centrifugation, des aliquotes de 50, 100 et 200 µl de surnageant sont reprises pour le dosage.

Planche V : Dissection des fragments de cerveaux dans lesquels le LRF sera dosé :

a- chez le cobaye

b- chez le singe écureuil.

Coupes sagittales

CA : commissure blanche antérieure

CM : corps mamillaire

CO : chiasma optique

LA : lobe antérieur } hypophyse

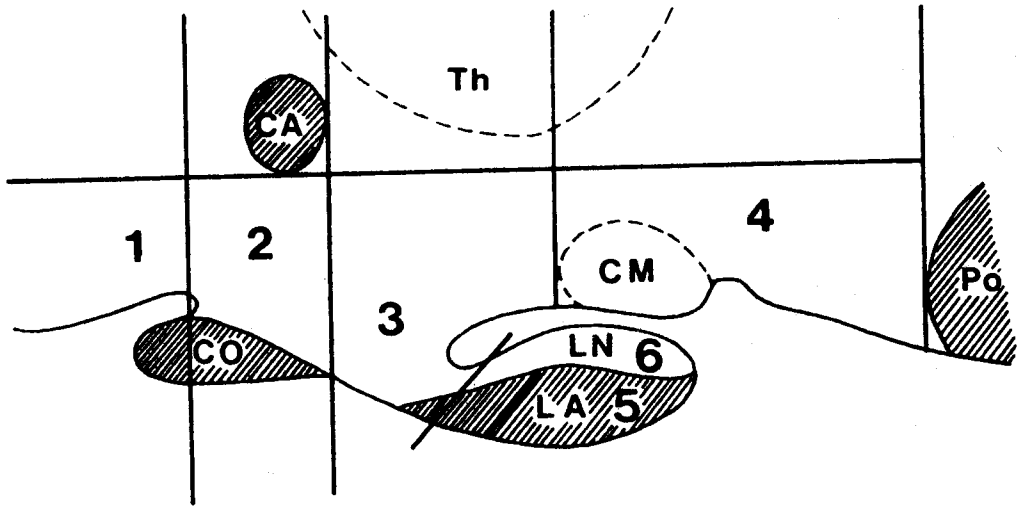
LN : lobe nerveux }

Po : pont

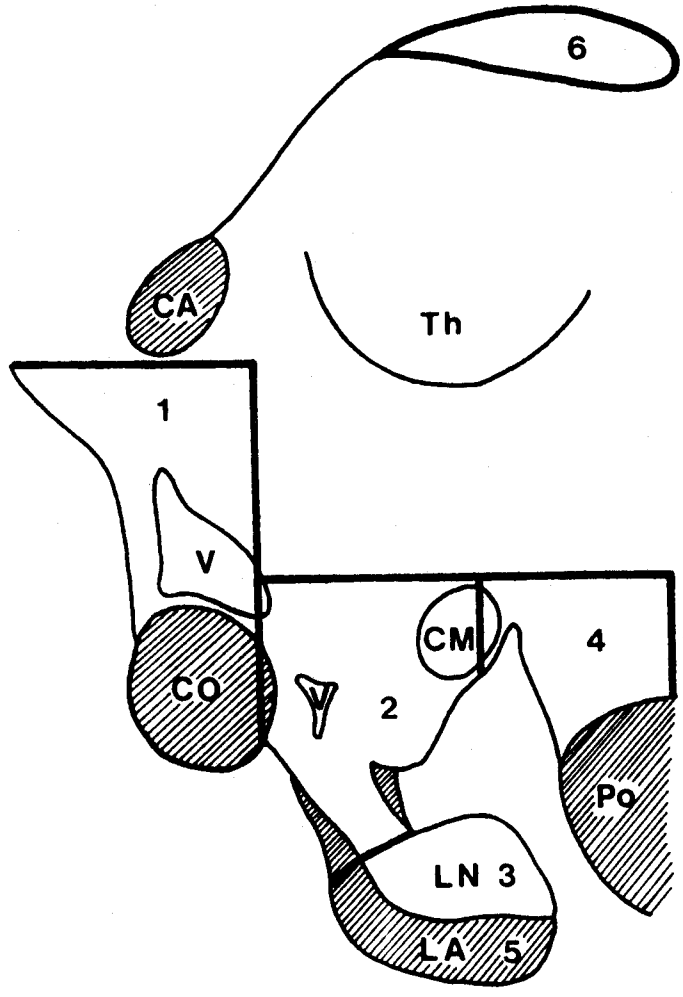
Th : thalamus

V : IIIème ventricule

a



b



C - Antisérums

Il est possible d'obtenir des antisérums anti LRF par immunisation de lapins contre la molécule de LRF synthétique non conjuguée uniquement adsorbée sur polyvinylpyrrolidone (ARIMURA 1973, BARRY 1980), mais il est alors difficile, en raison du faible poids moléculaire du LRF et de sa faible antigénicité, d'obtenir ainsi un titre très élevé en anticorps.

Il s'est donc avéré souvent utile de coupler le LRF à une molécule importante comme l'albumine sérique bovine ou humaine.

Couplage à la glutaraldéhyde du LRF à la HSA (DUBOIS 1976)

sont additionnés :

- 4 mg d'antigène et 20 mg de HSA dans 2 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 :
  phosphate monosodique 0,1 M 192 ml
  phosphate disodique 0,1 M 808 ml

- 1 ml d'une dilution au 1/50ème (dans le tampon phosphate) de la solution commerciale de glutaraldéhyde à 25 %

On laisse s'effectuer la réaction 3 h à température ambiante sous agitation douce.

- La réaction est arrêtée par 1 ml de tampon phosphate contenant 7,5 mg de métabisulfite

- 1 ml de tampon supplémentaire est ajouté.
  On obtient 5 ml de solution qui sont ensuite dialysés à 4°C contre du tampon.

Chaque dose injectée à un lapin sera de 0,5 ml de cette solution (soit 400 µg de LRF conjugué) émulsionnée avec 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund.

Pour la fabrication de son antisérum n° 8516, DUBOIS a effectué la première injection dans la rate, les 6 suivantes, soit par 40 sites intradermiques, soit par injection intraveineuse de LRF conjugué sans adjuvant. Parmi les antisérums que nous avons essayés et qui ont donné des résultats

très satisfaisants (BARRY, n° 21a, 41, 42, 44 - DUBOIS : 2 Ac ≠), c'est ce dernier qui présentait le titre le plus élevé, aussi nous avons choisi de l'utiliser pour l'ensemble de nos dosages ; ses caractéristiques ont été décrites par CARATY et coll. 1980 ; il est très spécifique et ne présente aucune affinité pour d'autres peptides ou hormones tels la lysine vasopressine, la LH, la FSH, le TRF, l'ocytocine, la noradrénaline ou pour des extraits du cortex cérébral. Pour éliminer la majeure partie des anticorps dirigés contre la HSA, l'antisérum est tout d'abord saturé par la HSA ; après centrifugation, le surnageant est prélevé. Dans nos dosages, il a été utilisé à la dilution finale de 1/32000.

D - Dosage

La technique de dosage que nous avons utilisée est ici l'immuno-précipitation à température ambiante.

La composition du tampon de dosage est la suivante :

phosphate	0,01 M
NaCl	0,15 M
NaN3	0,1 p. 100
EDTA	0,01 M
Bacitracine	2.10^{-5} M
HSA	0,1 p. 100
pH 7,5	

sont additionnés :

- 0,1 ml de LRF froid (SERVA) à différentes dilutions et 0,1 ml de tampon
  ou
  0,05 ; 0,1 ou 0,2 ml d'extraits tissulaires complétés à 0,2 ml avec du tampon
- 0,1 ml d'antisérum anti LRF dilué au préalable à 1/8000
  Agitation brève suivie d'une préincubation de 4 heures (minimum)
- on ajoute 0,1 ml de LRF marqué ($\simeq$ 10.000 cpm)
  Agitation brève puis incubation de 24 heures
- on ajoute 50 µl de sérum de lapin normal dilué au 1/50ème et 50 µl d'anti-gammaglobulines de lapin diluées au 1/5ème
  Agitation brève puis incubation de 24 heures.

Chaque tube est additionné de 2,5 ml de tampon sans HSA et centrifugé ; le surnageant est aspiré et la radioactivité du précipité est comptée.

Les essais sont effectués en triple pour la courbe standard et à deux dilutions et en double pour chaque extrait.

IV - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE L'ACTH ET DU CORTISOL

A - Dosage de l'ACTH

L'ACTH (adrenocorticotrophic hormone) est une hormone hypophysaire de nature protéinique (composée de 39 acides aminés), de poids moléculaire $\simeq$ 4 500. La séquence 1-24 à partir de la partie N-terminale est commune à différentes espèces et hormonalement active ; le polypeptide de synthèse 1-24 correspondant (synacthène) est couramment utilisé en clinique.

Dans le plasma, l'ACTH a une demi-vie d'environ 12 à 15 minutes (BESSER et coll. 1971).

La production de l'ACTH (synthèse et sécrétion : GANONG et coll. 1974) est contrôlée par le CRF (corticotrophin releasing factor) qui est libéré dans les vaisseaux portes de l'éminence médiane (PORTER et coll. 1970).

Les corps cellulaires de la plus grande partie des neurones élaborant le CRF se situent fort probablement dans l'hypothalamus (mais en dehors de l'hypothalamus médiobasal) et dans l'aire préoptique ; leurs fibres traversent l'aire latérale rétrochiasmatique avant de gagner l'éminence médiane (BRADBURY et coll. 1974, PALKOVITS 1977, JONES et HILLHOUSE 1977, BUCKINGHAM et HODGES 1979, MAKARA et coll. 1979).

Les neurones à CRF recevraient de nombreuses afférences modulant leur activité (VAN LOON 1973), ainsi la libération du CRF serait inhibée par les récepteurs α-adrénergiques et stimulée par les récepteurs muscariniques et nicotiniques (Réf. dans OLIVER et coll. 1980).

En outre, la sécrétion d'ACTH est stimulée lors d'un stress et est soumise à un rythme circadien, mais, à la différence d'HIROSHIGE et coll. (1971), YASUDA et GREER (1976) n'ont pu établir aucune corrélation entre ces variations de la sécrétion d'ACTH et l'activité CRF de l'hypothalamus. Le rythme circadien de la sécrétion d'ACTH pourrait être accompagné de variations simultanées de la sensibilité de l'hypophyse au CRF, mais, là encore, ceci n'a pu être montré avec certitude (KRIEGER 1979).

Dans nos expériences, les dosages de l'ACTH ont été effectués avec le matériel proposé par le C.E.A.

1) Prélèvements des échantillons

- ils doivent se faire en tenant compte de la périodicité de la sécrétion de l'ACTH

- en raison de l'instabilité de cette molécule, ils nécessitent certaines précautions :
  le sang ne peut être recueilli sur héparine ; en effet, l'héparine capte les molécules d'ACTH, formant des agrégats de hauts poids moléculaires et les empêchant de réagir avec les anticorps (DUPOUY et coll. 1980), en outre, elle accélère la dégradation de l'hormone marquée introduite dans le dosage (VAGUE et coll. 1971).

Le sang est alors recueilli dans des tubes de type Venoject contenant de l'EDTA (Na_2) sec (1 mg/ml de sang) préalablement refroidis.

Après agitation et centrifugation, les plasmas sont prélevés et conservés à - 20°C.

Pour une conservation dépassant 2 mois, il faut ajouter, au moment du prélèvement, 100 UKI sous forme de Zymofren ou de Trasylol, par millilitre de sang.

2) Dosage

Les dilutions sont effectuées dans le tampon :
Véronal 0,02 M pH 8,4
2-mercaptoéthanol 0,2 p. 100

Sont additionnés :

- 0,1 ml d'une solution contenant du plasma humain et de 0 à 800 pg/ml d'ACTH synthétique humaine (1-39) - (courbe standard effectuée en triple)
  ou 100 µl, 200 µl de plasma à doser.
- 0,1 ml d'une solution d'ACTH d'origine porcine marquée à l'iode ^{125}, d'activité spécifique de l'ordre de 300 µCi/µg (11 100 kBq/µg), soit 0,06 µCi/ml (2,22 kBq)

Cette solution, en tampon véronal, contient en outre de l'albumine humaine et un inhibiteur enzymatique.

- 0,1 ml d'une solution contenant de l'antisérum anti-ACTH (obtenu sur lapin par injection d'ACTH couplée à de l'albumine bovine).

Chaque tube est alors complété à 1 ml par du tampon.

Après agitation au Vortex, on laisse incuber 48 h à 4°C.

Les tubes sont alors plongés dans un bain glacé et 0,5 ml d'une suspension de charbon sont additionnés rapidement.

Après agitation rapide au Vortex, et un temps de réaction de 5 minutes exactement dans le bain de glace, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 1500-2000 g.

Le surnageant de chaque tube est décanté dans un tube de comptage.

B - Dosage du cortisol

Le cortisol, ou hydrocortisone, est une hormone stéroïdienne de poids moléculaire 363,5. La cortico-surrénale synthétise le cholestérol, le prélève également de la circulation et le transforme en hormones stéroïdiennes, notamment en cortisol (Tableau IV, p. 60).

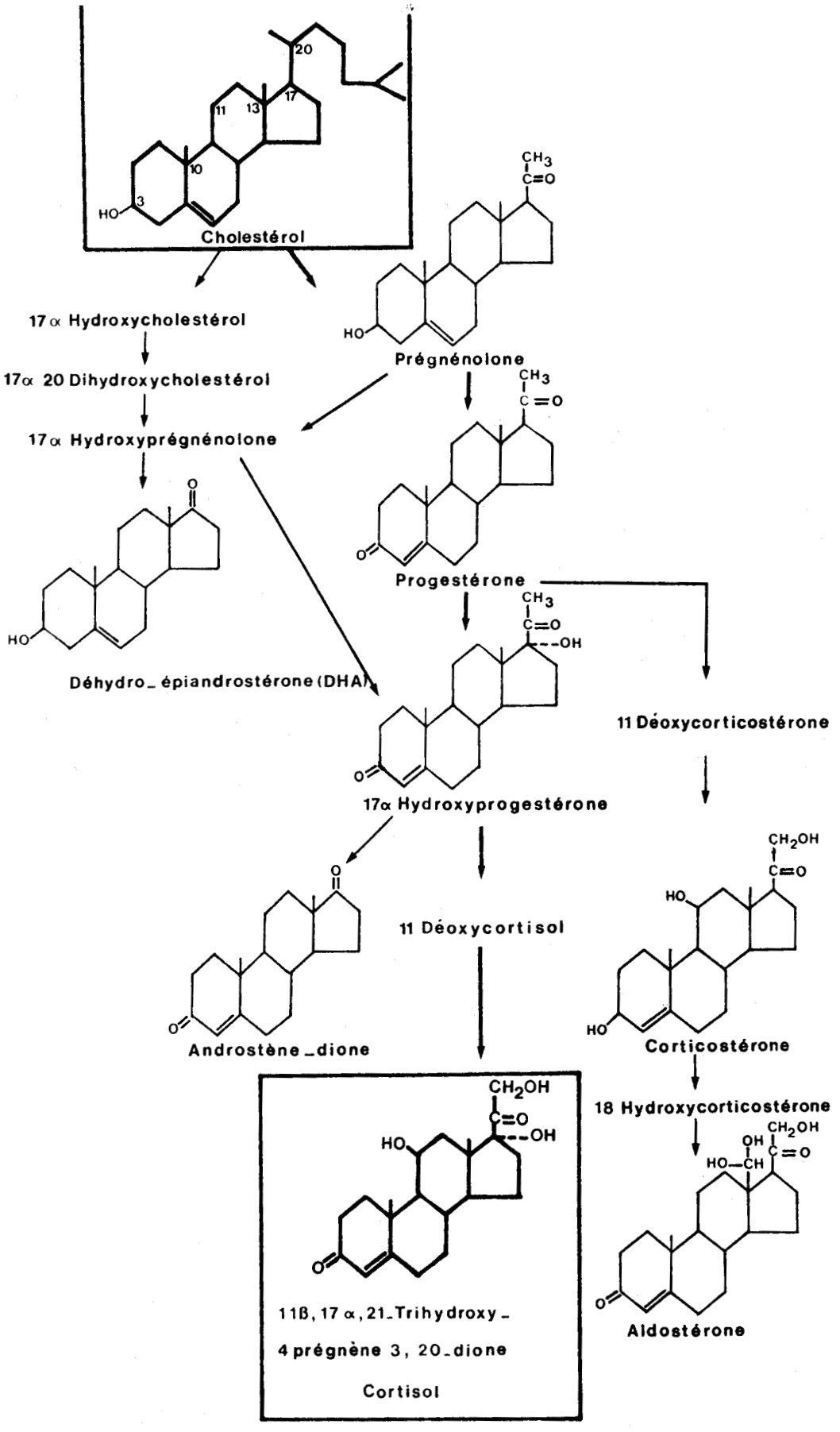
Ce cortisol est produit en partie par les cellules de la glomérulée (qui sont les seules, en outre, à synthétiser l'aldostérone) mais principalement par les cellules de la fasciculée.

Les glucocorticoïdes sont des effecteurs d'enzymes et possèdent des récepteurs sur les tissus de nombreux organes (foie, muscles, cellules lymphoïdes, adipocytes, os, cerveau, utérus, etc...) Réf. dans BALLARD et coll. 1974 et KING et MAINWARING 1974 ; ainsi, dans les cellules intestinales, ils permettent la phosphorylation des sucres nécessaires à leur absorption ; les principaux effets biologiques du cortisol sont : l'accumulation du glycogène au niveau du foie, la synthèse du glucose à partir des acides aminés (néoglucogénèse) et le ralentissement de l'oxydation des hydrates de carbone dans les tissus.

La production de cortisol est stimulée par l'ACTH, mais le cortisol, en revanche, exerce un rétrocontrôle négatif sur cette hormone, soit par l'intermédiaire des centres hypothalamiques produisant le CRF, soit directement au niveau de l'hypophyse où il aurait alors une action inhibitrice plus sur la sécrétion que sur la synthèse de l'ACTH (FLEISCHER et RAWLS 1970).

Du rôle joué par l'ACTH sur la production des corticoïdes, résulte un rythme nycthéméral des taux de cortisol plasmatiques ainsi que leur élévation à la suite d'un stress (dans les 15 minutes suivant l'élévation des taux d'ACTH), d'où les précautions nécessaires dans le choix de l'heure et des conditions de prélèvement des échantillons à doser.

Dans les conditions normales, environ 76 p. 100 du cortisol sécrété dans le sang sont liés de façon étroite mais réversible à la transcortine (corticosteroïd binding globulin ou CBG), alpha 1 glycoprotéine, de poids moléculaire voisin de 52 000 (SEAL et DOE 1966), synthétisée par le foie ; 13,5 p. 100 sont liés à l'albumine (avec une affinité 4 fois moindre que pour la CBG), et environ 10,5 p. 100 constituent le cortisol libre (WESTPHAL 1975).



BUS LILLE

TABLEAU IV : Biosynthèse du cortisol.

Le cortisol libre,seul métaboliquement actif, a une demi-vie de 50-60 minutes (MANIN et DELOST 1980).

Dans nos expériences, nous dosons le cortisol total à l'aide du matériel proposé par le C.E.A.

Il s'agit de mesures directes sur plasma ou sérum (VECSEI et coll. 1972, RUDER et coll. 1972, ABRAHAM et coll. 1972).

Les dilutions sont effectuées dans le tampon :
Hydrogénophosphate disodique, 2 H_2O 852 mg
Acide citrique 1,560 mg
pH 3,2.

Dans des tubes, dont la surface interne est revêtue d'un anti-sérum obtenu sur le lapin contre du cortisol conjugué en position 21 avec de la sérumalbumine bovine, sont ajoutés :

- 50 µl d'une solution contenant de 0 à 800 ng/ml de cortisol (courbe standard effectuée en triple)
  ou
  30 µl de sérum à doser + 20 µl de tampon (échantillons dosés en double)
- 0,5 ml de tampon
- 0,1 ml d'une solution de cortisol marqué à l'iode 125 (≃ 0,28 µCi/ml) contenant de la sérumalbumine bovine et des conservateurs.

Chaque tube est mélangé doucement au Vortex.

Après une heure d'incubation à 37°C, le contenu de chaque tube est aspiré soigneusement. Chaque tube est alors rincé par 2 ml d'eau distillée et de nouveau aspiré, puis la radioactivité est comptée.

V - ANIMAUX

A - Cobayes

Les cobayes tricolores (Cavia porcellus) sont gardés dans des conditions d'éclairement constantes (L : O = 14 : 10) à 22 ± 2°C.

Afin de vérifier le parallélisme des courbes concernant les dosages des gonadotrophines dans les sérums, des cobayes ont été injectés de LRF ou castrés.

Une étude de l'évolution des taux des gonadotrophines sériques au cours du cycle oestral a ensuite été effectuée.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation ; leur sang, récolté individuellement, est laissé pendant un temps minimum de 30 mn à 4°C pour que la coagulation s'effectue. Après centrifugation le sérum est prélevé et conservé à - 20°C jusqu'au moment du dosage.

1°) 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 2 h 30 après l'injection. Les dosages radio-immunologiques de LH, FSH et testostérone ont été effectués sur les sérums à différentes dilutions.

2°) Castration

Des cobayes mâles de 450 g ont été castrés bilatéralement après anesthésie par injection intrapéritonéale de 0,85 ml d'uréthane à 20 p.100 et de 0,15 ml de Nembutal à 5 p.100. Les animaux ont été sacrifiés dans des délais variant de 24 heures à 97 jours après la castration.

3°) 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 a, b, 1962.

Notre étude a porté sur deux séries de respectivement 60 et 123 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 "SIII" de composition :

alcool à 50°	100 ml
Biebrich Ecarlate hydrosoluble	0,5 g
Orangé G	0,25 g
Fast green FCF	0,075 g
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 nucléoplasmatique élevé et à cytoplasme basophile ; en prooestrus II, de grandes cellules basophiles, muqueuses, à noyau le plus souvent pycnotique ; en oestrus préovulatoire apparaissent des cellules éosinophiles à noyau pycnotique provenant de la desquamation de la couche kératinisée ; en oestrus post-ovulatoire, ces cellules sont plissées et s'agglutinent 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 post-oestrus II, les cellules éosinophiles ont totalement disparu, tandis que les polynucléaires envahissent les cellules basophiles.

Le premier 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 picrique	4 g
	acétate de cuivre	2,5 g
	H_2O	100 ml
formol neutre	10 ml	ajoutés extemporanément
sublimé (solution aqueuse saturée de $HgCl_2$)	10 ml	ajoutés extemporanément

Les pièces sont ensuite déshydratées 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_2O	100 ml
H_2SO_4	1,6 ml

alcool 95°	100 ml
Hématoxyline	1 g

- lavage à l'eau courante : 5 mn
- H_2O ammoniaquée (2 p. 100) : passage rapide
- Fuchsine Ponceau : 3 mn

Ponceau S	2 g
Fuchsine acide	1 g
H_2O	300 ml
Acide acétique	2 ml

- Acide phosphomolybdique (2 p. 100) : passage rapide
- Orangé G : 5 mn

Orangé G	8 g
H_2O	400 ml
Acide phosphomolybdique	16 g

- H_2O acétifiée (1 p. 100) : passage rapide
- Vert FCF : 2 mn

Vert solide FCF	2 g
H_2O	200 ml
Acide acétique	1 ml

- H_2O 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.

B - Singes écureuils

Les singes écureuils (Saimiri sciureus) nous ont été procurés par Primate Imports Corporation (New York, U.S.A.) via Charles-River-France. Ces animaux ont été gardés à 24 ± 2°C avec un éclairage programmé (L : O = 12 : 12).

Le sacrifice a eu lieu par décapitation, le plus souvent vers 17 heures, généralement entre les mois de mars à juin.

1°) Le parallélisme des courbes concernant les dosages des gonadotrophines sériques a été vérifié sur des sérums (à différentes dilutions) de singes écureuils mâles qui avaient reçu une injection de LRF synthétique (sacrifiés 1 h 30 après l'injection), ou qui avaient été castrés (sacrifiés 15 jours après la castration).

2°) Cycle oestral :

L'étude concernant les variations des taux sériques de gonadotrophines et de progestérone a été effectuée sur 75 femelles adultes jeunes, d'environ 500 g. Les variations du LRF hypothalamique chez ces animaux ont été étudiées simultanément, soit par dosages radio-immunologiques (étude qui porte sur 25 animaux), soit par des observations en immunofluorescence (BARRY et CROIX 1978, BARRY 1979 b).

Le cycle oestral du singe écureuil aurait, aux dernières estimations, une durée moyenne de huit jours (WILSON 1977) en accord avec les évaluations précédentes de ROSENBLUM 1968, HUTCHINSON 1970, O'CONNOR et WOLF 1971, TRAVIS et HOLMES 1974.

Nous nous sommes basé sur ces données et sur l'examen histologique des coupes sériées des ovaires (taille et état des follicules) pour établir les graphiques : phase folliculaire précoce (follicules de diamètres inférieurs à 2 mm), phase folliculaire moyenne (follicules de diamètres compris entre 2 et 3 mm), phase folliculaire tardive (diamètres supérieurs à 3 mm jusqu'aux follicules ovulatoires), phase lutéale (présence de corps progestatifs résultant de la lutéinisation de follicules rompus).

Nous avons appelé jour 1 le jour de l'ovulation.

R E S U L T A T S

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 :

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

dans lequel BO 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) Antisérum :

a) Systèmes homologues de rat :

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}I ; l'antisérum anti LH de rat, à la dilution de 1/150 000, 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 l'^{125}I lorsqu'il est utilisé à la dilution de 1/8000 et 19 à 24 p. 100, à la dilution de 1/4000.

Le premier antisérum anti FSH humaine que nous avons utilisé en fixe 11 p. 100 à la dilution de 1/20 000 ; le second (Calbiochem) en fixe 30 p. 100 à la dilution de 1/2000.

L'antisérum anti LH ovine peut fixer 26 à 38 p. 100 de la LH de rat marquée à l'^{125}I lorsqu'il est utilisé à la dilution de 1/32 000 et 50 p. 100 à la dilution de 1/24 000.

Nous n'avons obtenu aucune fixation de la LH de rat ou de la LH ovine sur l'antisérum anti HLH de Calbiochem; nous n'avons obtenu qu'une très faible fixation de ces hormones (6 p. 100) sur l'antisérum anti HLH fourni par le C.E.A.

Ces antisérums anti LH humaine semblent donc très spécifiques de l'espèce.

c) Systèmes homologues humains :

L'antisérum anti FSH humaine de Calbiochem, à la dilution de 1/2000, fixe 36 à 44 p. 100 de la FSH humaine marquée.

L'antisérum anti LH humaine de Calbiochem, à la dilution de 1/4000, fixe 50 p. 100 de la LH humaine marquée, celui de l'Institut Pasteur, à la même dilution, en fixe 26 p. 100, tandis que celui fourni par le C.E.A. en fixe 35 p. 100.

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 μ théorique)

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

- x : écart d'une valeur à la moyenne

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

- la variance S^2 (estimation de la variance σ^2 théorique)

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

- l'écart-type ou déviation standard S (estimation de σ)

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

- 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 pour les dosages concernant les cobayes ; 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.

Pour les dosages de FSH et de LH des singes, ces coefficients se situent entre 0,7 et 4,8 p. 100 avec des valeurs moyennes de 3,3 et 3,4 p. 100, respectivement.

Les coefficients de variations intersystèmes sont nettement plus élevés, pour cette raison, tous les échantillons concernent 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, MIDGLEY et coll. 1969).

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

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

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

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

La sensibilité ainsi définie est de l'ordre de 0,95 ng de NIAMD rat FSH RP_1 pour le dosage de la FSH et de 0,22 ng de NIAMD rat LH RP_1 pour le dosage de la LH, dans les systèmes hétérologues utilisés pour les cobayes.

Ces valeurs correspondent à des diminutions de 5 à 10 p. 100, suivant les dosages, de la radioactivité fixée à l'anticorps.

La sensibilité est de l'ordre de 0,1 à 0,2 mUI de FSH et de 0,05 à 0,2 mUI de LH, suivant les dosages, dans les systèmes homologues humains utilisés pour les singes écureuils.

B - Obtention de systèmes permettant les dosages radio-immunologiques des gonadotrophines de cobaye et de singe écureuil

1) Dosage de la FSH

a) Système homologue de rat :

L'addition d'extrait acétonique hypophysaire de cobaye, même en quantités très élevées (5 µg), ou de singe (jusqu'à 200 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 les FSH de cobaye et de singe contenues dans les extraits tissulaires ne provoquent pas de compétition pour se fixer à ces anticorps. Ce système est donc inutilisable pour le dosage de la FSH de cobaye ou de singe.

b) Systèmes hétérologues :

α. comprenant de la FSH marquée de rat et des antisérums anti FSH ovine : système mis au point pour le dosage de la FSH de rat par HENDRICK et coll. 1971.

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 acétonique 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° 5, p. 73) ; ceci indique que la réaction croisée entre la FSH de cobaye et 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 µg de NIAMD rat FSH RP_1/mg. Chez certains jeunes il est possible de trouver une activité immunologique atteignant 25 µg de NIAMD rat FSH RP_1/mg.

Les préparations partiellement purifiées de FSH de cobaye (CFSH DE_1 et CFSH A_3) ont été dosées dans ce système (Tableau V,p. 74) ;

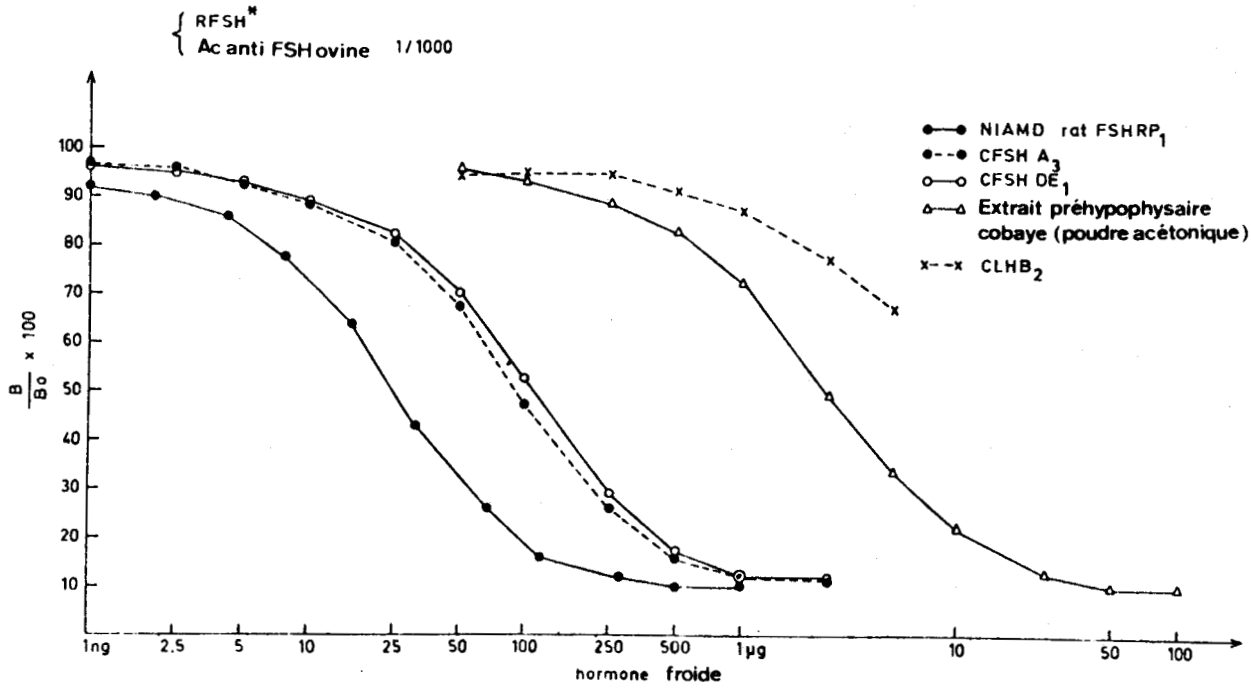


Figure n° 5 : Déplacement de la RFSH* fixée aux anticorps anti FSH ovine, par la RFSH non marquée et par les extraits antéhypophysaires de cobaye. Les fractions riches en FSH de cobaye inhibent complètement la fixation de la RFSH* aux anticorps anti FSH ovine. La fraction LH n'inhibe cette réaction que pour des concentrations élevées.

Fraction	Poids (mg/g poudre acétonique)	F S H			L H		
		Equivalent NIAMD rat $FSHRP_1$ (µg/mg)	Activité spécifique	Rendement	Equivalent NIAMD rat $LHRP_1$ (µg/mg)	Activité spécifique	Rendement
poudre acétonique	1000 (770 pré-hypophyses)	7 - 10	0,007-0,01	100	30 - 60	0,03-0,06	100
glyco-protéines	8,8 - 19,5	70	0,07	8,6-13,7	330 - 450	0,45	13 - 15
CM_1	1,8 - 2,4	152	0,15	5,2	20 - 70	0,02-0,07	0,06
CM_2	2,2 - 2,5	3,8	0,004	0,14	930 - 1200	1,2	10
CFSH DE_1	0,35 - 0,6	170 - 225	0,2	2	-	-	-
DE_2	0,9 - 1,2	-	-	-	-	-	-
CFSH A_3	0,8	250 - 300	0,3	3,4	12,5	0,01	0,03
CLH B_2	2	2,9	0,003	0,1	1500	1,5	10

TABLEAU V : Activités (déterminées par dosages radio-immunologiques) et poids des fractions de gonadotrophines extraites à partir d'antéhypophyses de cobayes.

BIUS LILLE

elles diminuent la radioactivité fixée aux anticorps en présentant une courbe de décroissance dont la pente est également identique à celle de la courbe de référence de rat (Fig n° 5, p. 73) ; 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_1) ou ne réagissent qu'à des concentrations très élevées (CFSH A_3) dans le système de dosage de LH ; le rapport des quantités de CFSH A_3 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.

Les courbes obtenues à partir de dilutions de sérums de cobayes (mâles et femelles impubères et adultes) sont parallèles à celles obtenues à partir des extraits hypophysaires (Fig. n° 6, p. 76). Il y a donc analogie immunologique entre la FSH hypophysaire et la FSH sérique du cobaye. Il est possible de détecter 4,3 ng de FSH/ml.

Dans ce système, nous avons également obtenu une réaction immunologique croisée complète avec un extrait hypophysaire de canard (CROIX et coll. 1974).

Mais, alors que la FSH humaine provoque également une compétition, les sous-unités α de l'HCG humaine et β de la FSH humaine n'entraînent aucune inhibition de la fixation de la FSH marquée de rat aux anticorps anti FSH ovine (Fig. n° 7, p. 77).

Aucune inhibition n'est également obtenue par l'addition d'extraits préhypophysaires de singe (de 100 ng à 200 µg). La FSH sérique de singe, dont les quelques sites pouvant réagir avec l'antisérum anti OFSH sont probablement plus accessibles que ceux de la FSH des extraits tissulaires, présente une réaction croisée très partielle ; ainsi la dilution d'un échantillon de sérum, qui devrait provoquer une inhibition de 25 p. 100 de la radioactivité fixée aux anticorps, ne provoque-t-elle qu'une inhibition de 16 p. 100 de cette fixation.

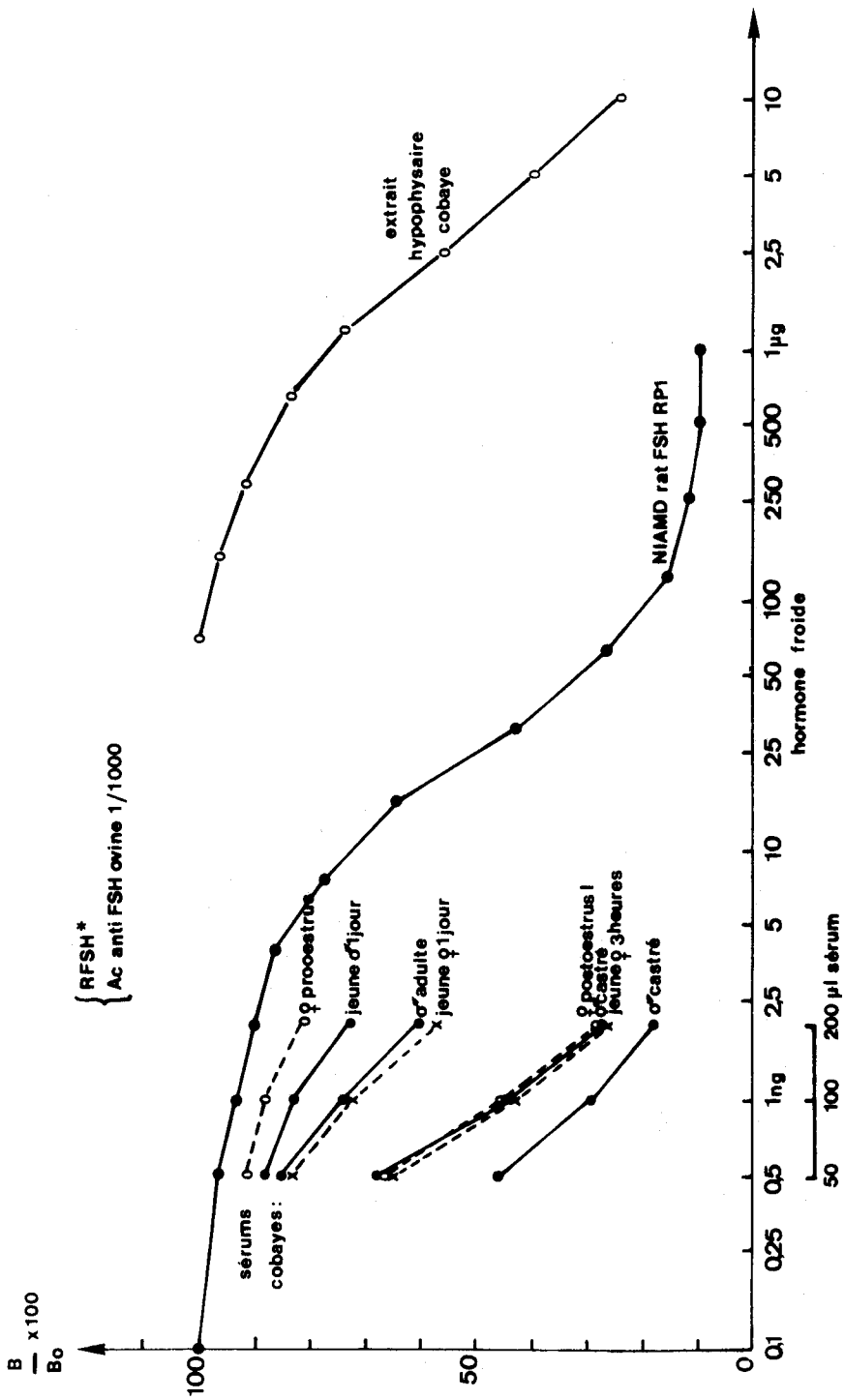


Figure n° 6 : Déplacement de la RFSH* fixée aux anticorps anti OFSH par la RFSH non marquée, l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié et des sérums de cobayes progressivement dilués.

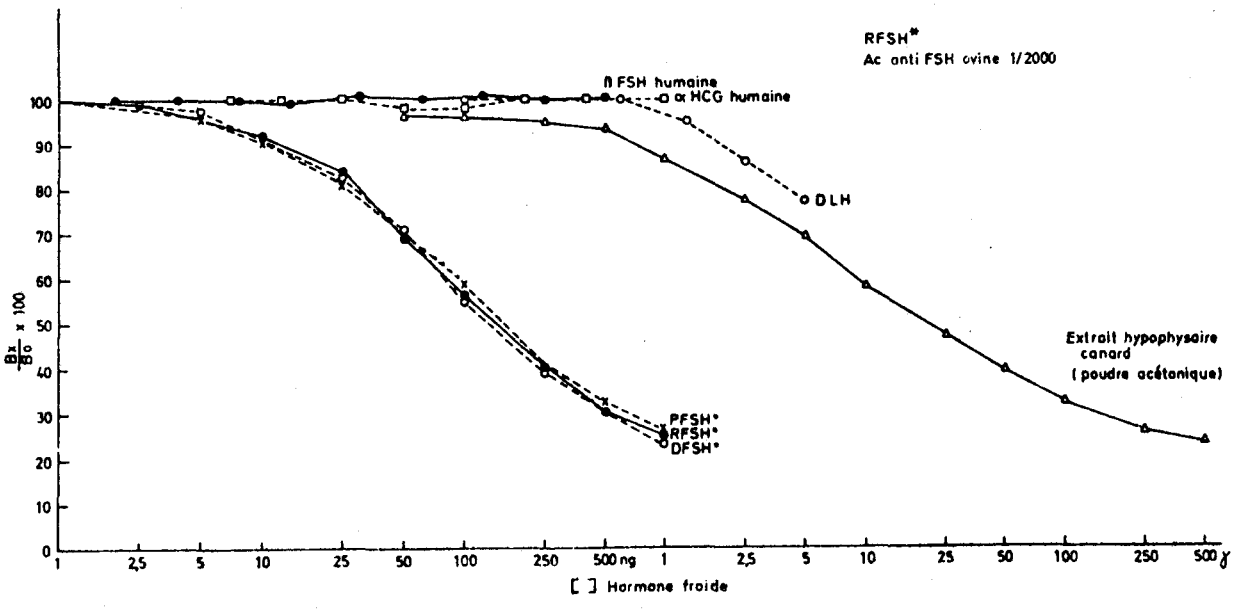


Figure n° 7 : Inhibition complète de la fixation de la FSH marquée de rat aux anticorps anti FSH ovine par la FSH de rat, de porc, de mouton et de canard.

Les sous-unités α de HCG et β de FSH n'entraînent aucune inhibition. La LH ovine inhibe cette réaction pour des quantités importantes en raison de sa contamination par la FSH.

BUS LILLE

La LH ovine, utilisée comme contrôle, n'entraîne une inhibition de la réaction que pour des quantités importantes, ceci en raison de sa contamination par la FSH.

Nous avons donc choisi d'utiliser ce système pour doser la FSH de cobaye mais il ne convient pas pour le dosage de la FSH de singe.

β. comprenant de la FSH marquée de rat et des antisérums anti FSH humaine :

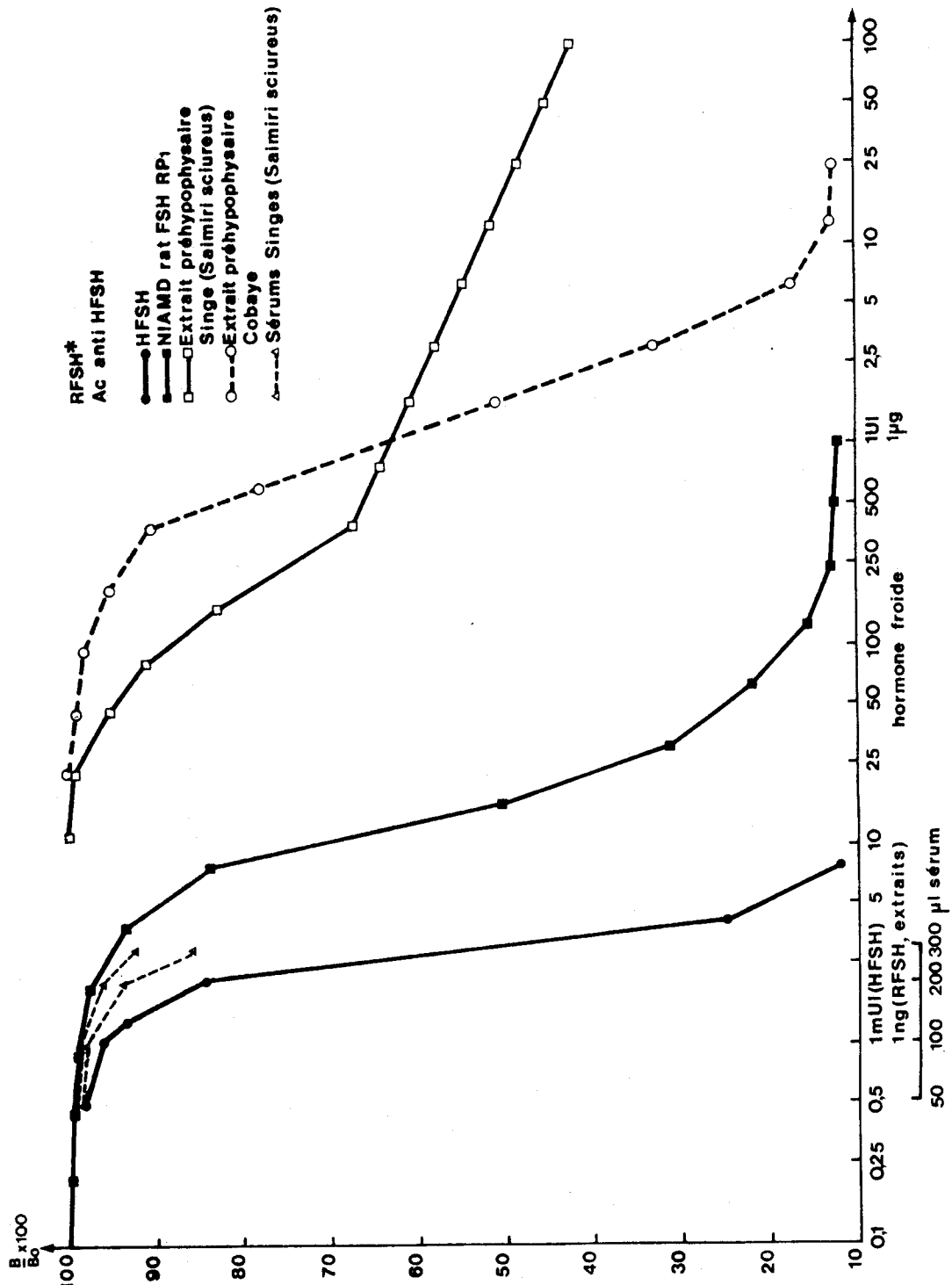
Dans ces systèmes, la FSH contenue dans les extraits préhypophysaires de cobaye présente une réaction croisée complète : la courbe de décroissance de la radioactivité fixée aux anticorps obtenue par l'addition d'extrait est parallèle à celle obtenue par l'addition d'hormone de référence de rat et ceci jusqu'à inhibition totale de la fixation de cette hormone marquée (Fig. n° 8,p. 79).

La FSH contenue dans les extraits préhypophysaires de singe provoque une compétition qui semble correcte jusqu'à addition d'environ 400 ng d'extrait (soit jusqu'à une inhibition de 33 p. 100 de la fixation de la FSH marquée aux anticorps anti HFSH) ; au-delà, la pente de la courbe change, la réaction croisée est très limitée, ceci probablement en raison du fait qu'il doit exister une population de sites de l'anticorps auxquels elle est incapable de se fixer ou pour lesquels elle ne présente qu'une très faible affinité ; de plus ceci peut encore être aggravé par la présence d'une quantité trop importante de matériel contaminant rendant l'accès des sites réactionnels de la FSH plus difficile.

Dans les sérums, au contraire, l'affinité de la FSH de singe pour les anticorps anti HFSH semble plus grande que celle de la FSH de rat et se rapproche de l'affinité de la FSH humaine.

Il faut remarquer que le décrochage de la RFSH marquée des anticorps anti HFSH s'effectue très rapidement par addition de FSH sérique de singe ou de HFSH (60 p. 100 entre 2 et 4 mUI) aussi, même en utilisant la courbe de HFSH comme référence, ce système ne convient pas pour le dosage de la FSH sérique chez le singe (et notamment chez les singes femelles dont les taux peuvent être élevés à certaines

Figure n° 8 : Déplacement de la RFSH* fixée aux anticorps anti HFSH par la HFSH, la RFSH non marquée, les extraits préhypophysaires de cobaye ou de singe et des sérums de singes progressivement dilués.


RFSH*
Ac anti HFSH
HFSH
NIAMD rat FSH RP1
Extrait préhypophysaire Singe (Saimiri sciureus)
Extrait préhypophysaire Cobaye
Sérums Singes (Saimiri sciureus)
B/Bo x100
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0,1
0,25
0,5
1mUI(HFSH)
5
10
25
50
100
250
500
1UI
2,5
5
10
25
50
100
1µg
hormone froide
1ng(RFSH, extraits)
50
100
200
300 µl sérum

périodes du cycle oestral, car il manquerait alors de sensibilité.

c) Système homologue humain :

La courbe obtenue par l'introduction d'extrait préhypophysaire non purifié de cobaye est parallèle à la courbe de décroissance de la radioactivité fixée aux anticorps anti HFSH obtenue par la compétition de FSH froide humaine, ceci jusqu'à addition d'approximativement 1,6 µg d'extrait de cobaye (ce qui correspond à une inhibition de la fixation de l'hormone marquée de 36 p. 100) ; la courbe ne dévie que très légèrement jusqu'à addition de 6 µg d'extrait (soit jusqu'à 60 p. 100 d'inhibition) ; au-delà la divergence est nette (Fig. n° 9, p. 81).

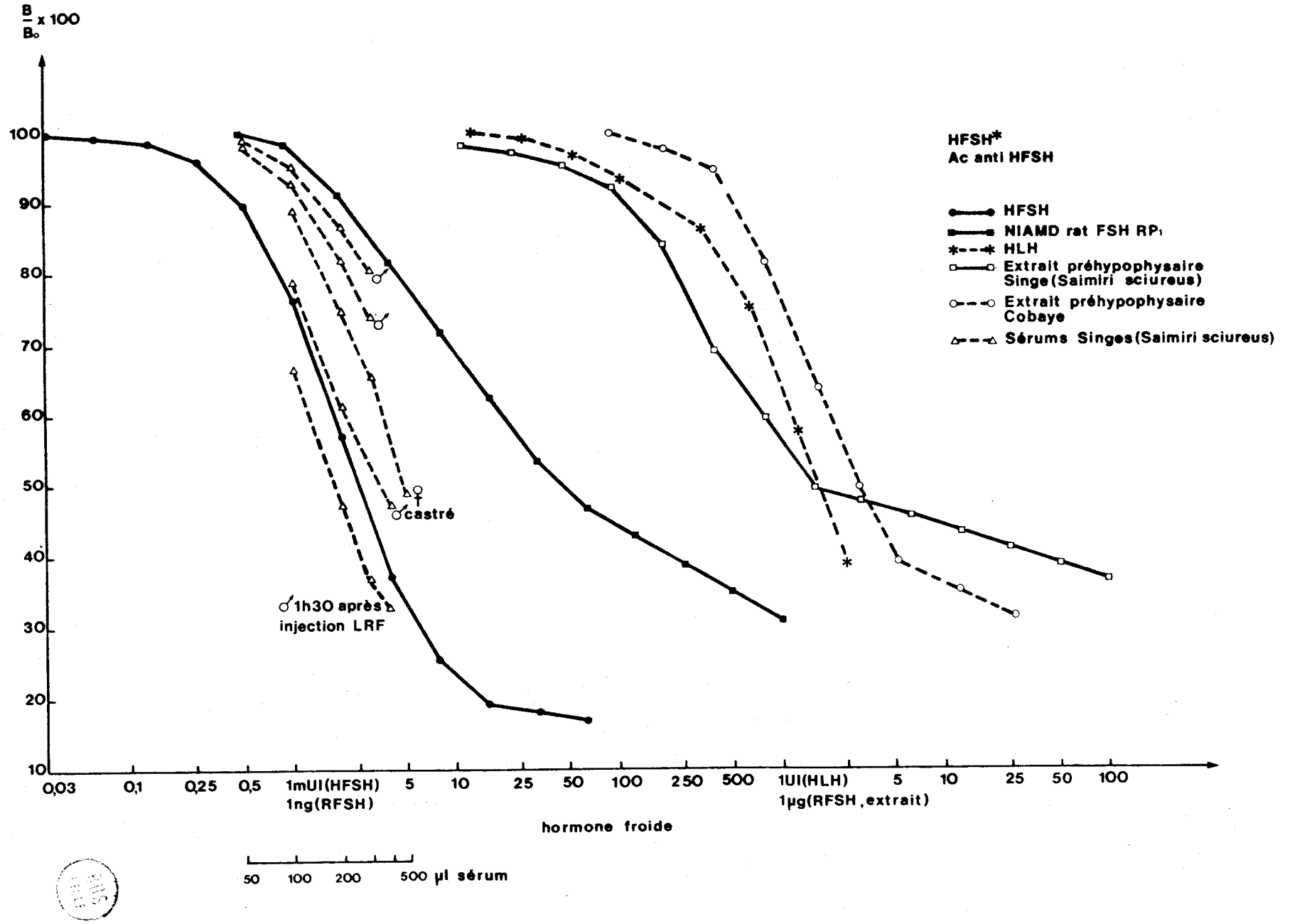
La FSH de cobaye possède donc un nombre assez important de sites capables de réagir avec les anticorps anti HFSH, ce qui explique la compétition complète qu'elle joue dans la réaction jusqu'à 36 p. 100 d'inhibition de la fixation de l'hormone marquée. Pour les sites restants de l'anticorps, il est probable qu'elle ne possède qu'une affinité très faible par rapport à celle de la HFSH.

La pente de la courbe obtenue par l'introduction d'extrait préhypophysaire de singe est relativement peu éloignée de celle de la courbe de référence humaine jusqu'à addition de 0,4 à 1,6 µg d'extrait (soit une inhibition de 32 à 50 p. 100 de la fixation) ; au-delà, la pente est nettement plus faible (Fig. n° 9, p. 81).

Bien que la FSH hypophysaire de singe écureuil possède probablement un nombre beaucoup moins élevé de sites avides ou capables de réagir avec les anticorps anti FSH humaine que la FSH humaine elle-même, les courbes obtenues à partir des dilutions des sérums de singes sont parallèles à la courbe de référence humaine et ceci jusqu'à provoquer une inhibition de la fixation de la HFSH marquée à l'antisérum anti HFSH d'au minimum 67 p. 100 (ce qui dépasse largement les taux d'inhibition que peuvent provoquer les adsorptions aspécifiques que présentent parfois certains sérums).Ceci confirme l'identité d'immunoréactivité que nous avions déjà trouvée (b β , p. 78), entre la FSH humaine et la FSH sérique du singe écureuil.

Il est possible de détecter 1 mUI/ml de FSH.

Figure n° 9 : Déplacement de la HFSH* fixée aux anticorps anti HFSH par la HFSH non marquée, la RFSH, la HLH, les extraits préhypophysaires de cobaye ou de singe et des sérums de singes progressivement dilués.


B/B₀ x 100
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
HFSH*
Ac anti HFSH
HFSH
NIAMD rat FSH RP₁
HLH
Extrait préhypophysaire Singe (Saimiri sciureus)
Extrait préhypophysaire Cobaye
Sérums Singes (Saimiri sciureus)
castré
♂ 1h30 après injection LRF
0,03
0,1
0,25
0,5
1mUI(HFSH)
1ng(RFSH)
5
10
25
50
100
250
500
1UI(HLH)
1µg(RFSH, extrait)
5
10
25
50
100
hormone froide
50
100
200
500 µl sérum

Ce système semble donc donner de très bons résultats pour le dosage de la FSH sérique chez le singe écureuil.

Il faut noter que la FSH de rat (NIAMD rat FSH RP_1) possède une affinité moins grande pour les anticorps anti HFSH que la FSH sérique de singe (confirmant ce que nous avions constaté b β), ce qui se traduit par une compétition incomplète dans la réaction, visible dès l'addition de plus de 3 ng de RFSH (soit au-delà de 15 p. 100 d'inhibition de la fixation de l'hormone marquée).

La HLH n'entraîne une inhibition de la réaction que pour des quantités très importantes (650 fois celle de la HFSH) ceci en raison de sa contamination par la FSH.

2) Dosage de la LH

a) Système homologue de rat :

L'addition d'extrait hypophysaire de cobaye ne provoque une décroissance significative de la radioactivité fixée aux anticorps que pour des valeurs élevées (Fig. n° 10, p. 83); en effet la pente de la courbe est différente de celle obtenue par l'addition de LH de rat froide, montrant ainsi une affinité nettement moins grande de cet antisérum pour la LH de cobaye que pour la LH de rat.

L'addition d'extrait hypophysaire de singe (jusqu'à 200 µg) est sans effet sur la réaction.

Nous ne retiendrons donc pas ce système de dosage.

b) Systèmes hétérologues :

Comprenant de la LH marquée de rat et des antisérums anti LH ovine : systèmes mis au point par NISWENDER et coll. 1968 a-b, pour le dosage de la LH chez différents mammifères (bovins, porcins, rats).

Chez le cobaye, 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° 11, p. 84). Cet extrait contient l'équivalent de 60 µg de NIAMD rat LH RP_1/mg. Nous n'avons cependant retenu qu'un seul antisérum afin d'effectuer les dosages ultérieurs dans des conditions reproductibles.

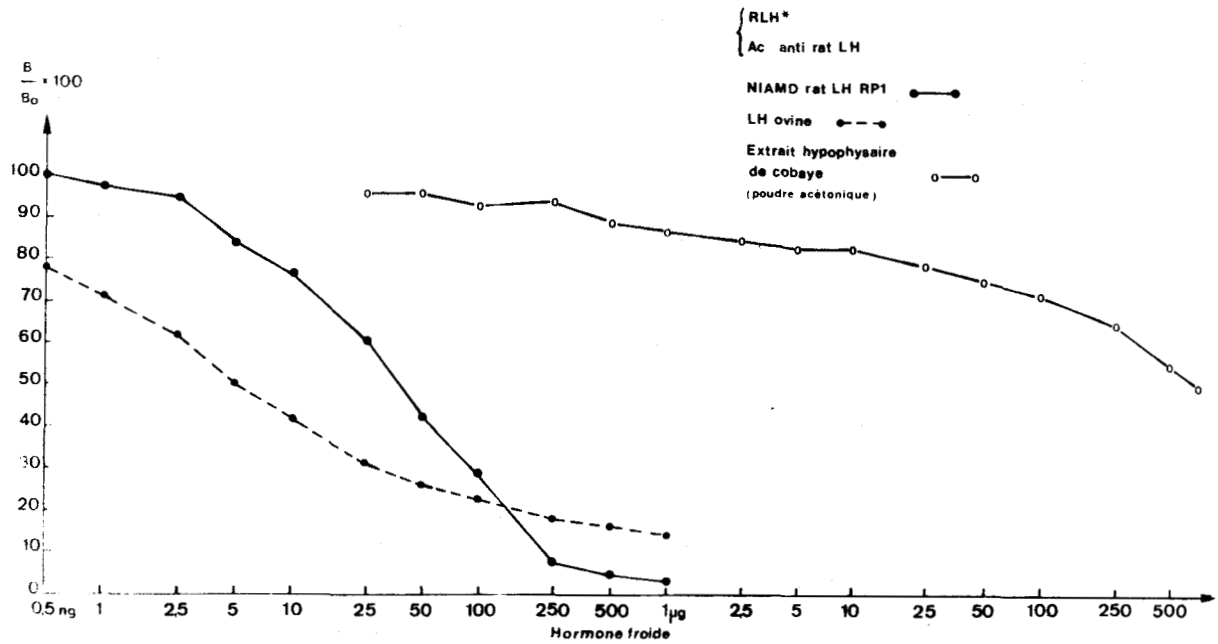


Figure n° 10 : Déplacement de la RLH* fixée aux anticorps anti LH de rat par la RLH non marquée, par la LH ovine et par l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié.

BUS LILLE

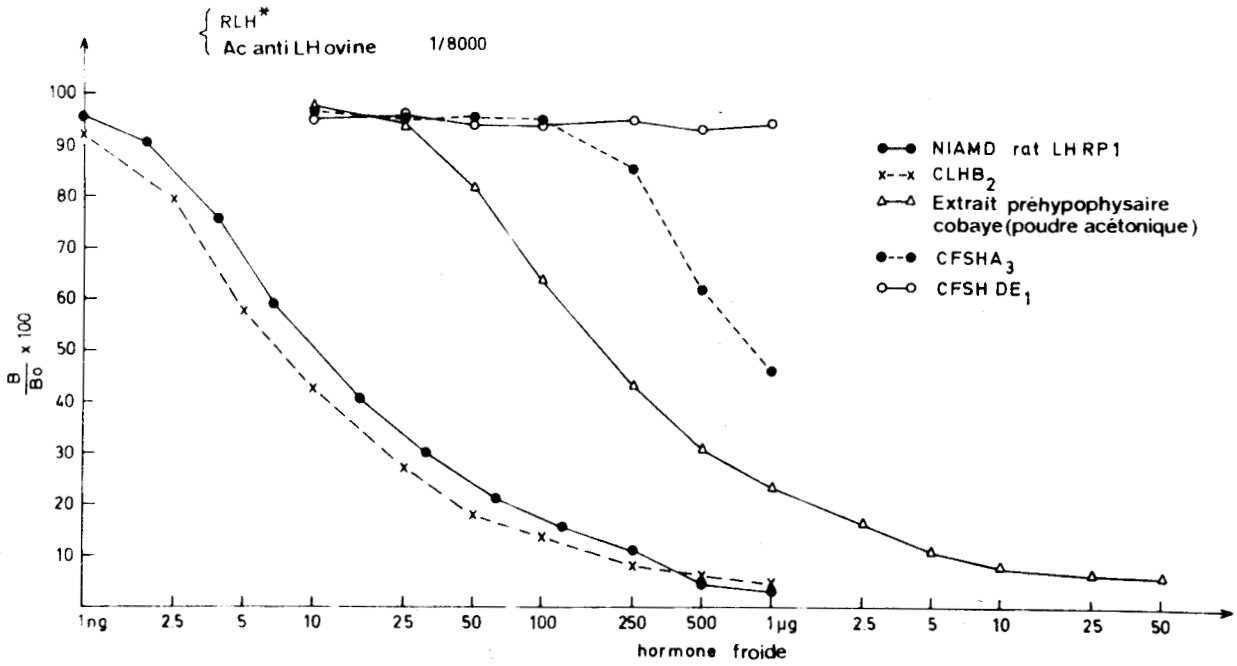


Figure n° 11 : Déplacement de la RLH* fixée aux anticorps anti LH ovine par la RLH non marquée et par les extraits antéhypophysaires de cobaye. La fraction riche en LH de cobaye inhibe complètement la fixation de la RLH* aux anticorps anti LH ovine. A des concentrations importantes, l'une des fractions enrichies en FSH inhibe également cette réaction en raison de sa contamination en LH.

La fraction purifiée LH B_2 de cobaye, dosée dans ce système, est plus immunoréactive que la préparation de référence NIAMD rat LH RP_1. Cette fraction ne réagit dans le système de dosage de FSH qu'à des concentrations très élevées. En effet, le rapport des quantités de $CLHB_2$ entraînant une réduction de 30 p. 100 de la fixation de la FSH marquée aux anticorps anti LH est de 1236.

Les courbes obtenues à partir de dilutions de sérums de cobayes (mâles et femelles impubères et adultes) sont parallèles à celles obtenues à partir des extraits hypophysaires (Fig. n° 12, p. 86). Il y a donc identité entre la LH hypophysaire et la LH sérique du cobaye. Il est possible de détecter 1,1 ng/ml de LH.

Dans ce système, l'extrait préhypophysaire de singe non purifié parvient à provoquer une compétition lorsque des quantités importantes sont ajoutées (1 à 100 µg). Ainsi l'addition de 100 µg d'extrait est nécessaire pour obtenir une inhibition de la fixation de l'hormone marquée de l'ordre de 38 p. 100 (Fig. n° 13, p. 87).

De même, l'addition de LH sérique ne provoque une inhibition que lorsque les sérums sont riches en LH (taux supérieurs à 12 mUI/ml) ; lorsque les sérums sont moins riches en LH, aucune compétition ne se produit.

Il semble donc y avoir un seuil minimal élevé de la concentration en LH de singe pour que celle-ci puisse jouer un rôle dans la réaction ; ce système manque donc énormément de sensibilité et provoque une sous-évaluation importante de la valeur en LH des extraits et sérums des singes ; néanmoins, il traduit la possibilité d'une certaine affinité de la LH de singe écureuil pour un antisérum anti LH ovine ; aussi des essais avec d'autres antisérums anti OLH pourraient peut-être apporter de meilleurs résultats.

On peut noter que l'extrait hypophysaire de canard ne présente aucune réaction croisée dans ce système.

c) Systèmes homologues humains :

Des essais ont été effectués sur trois antisérums différents.

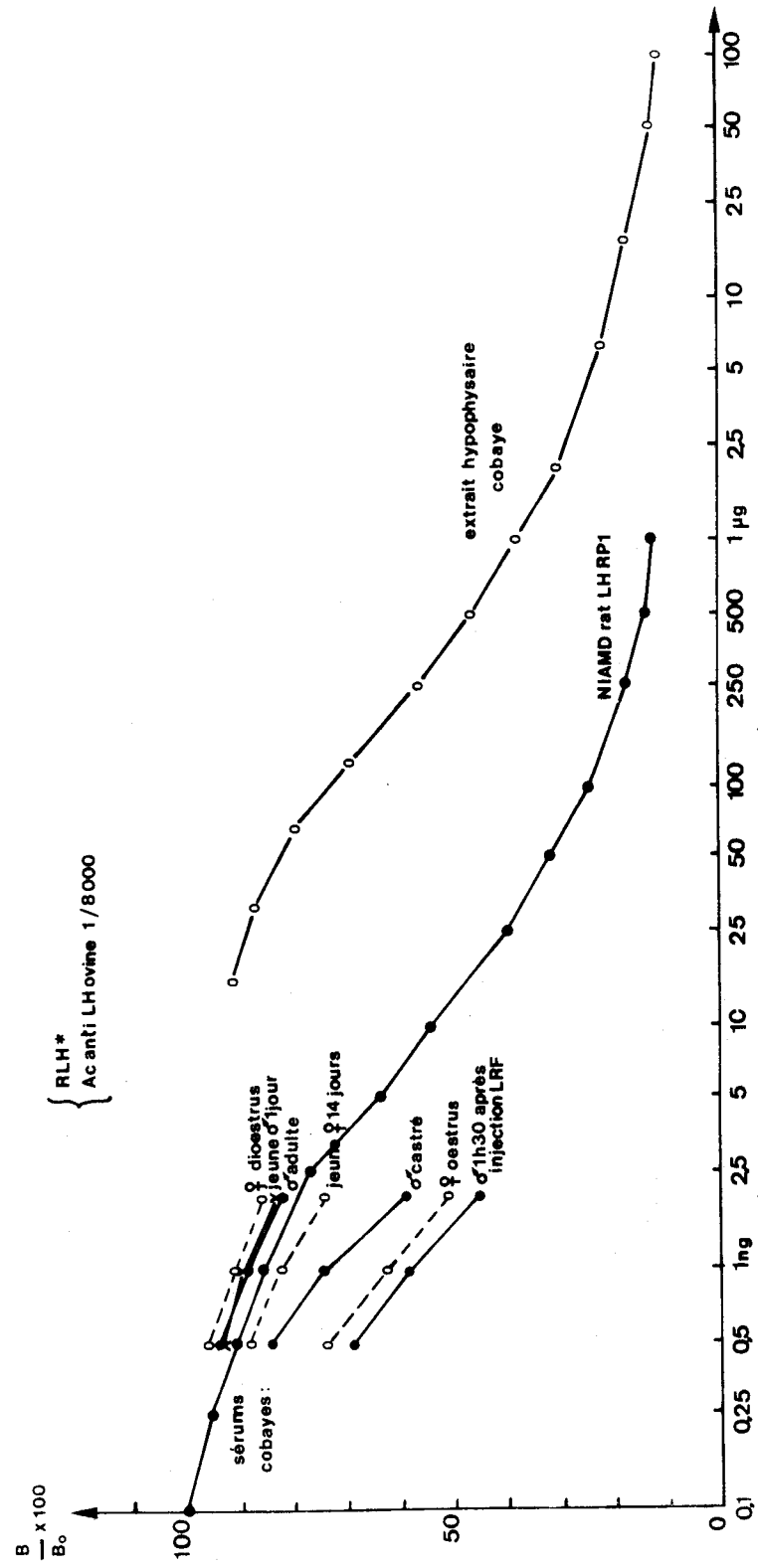
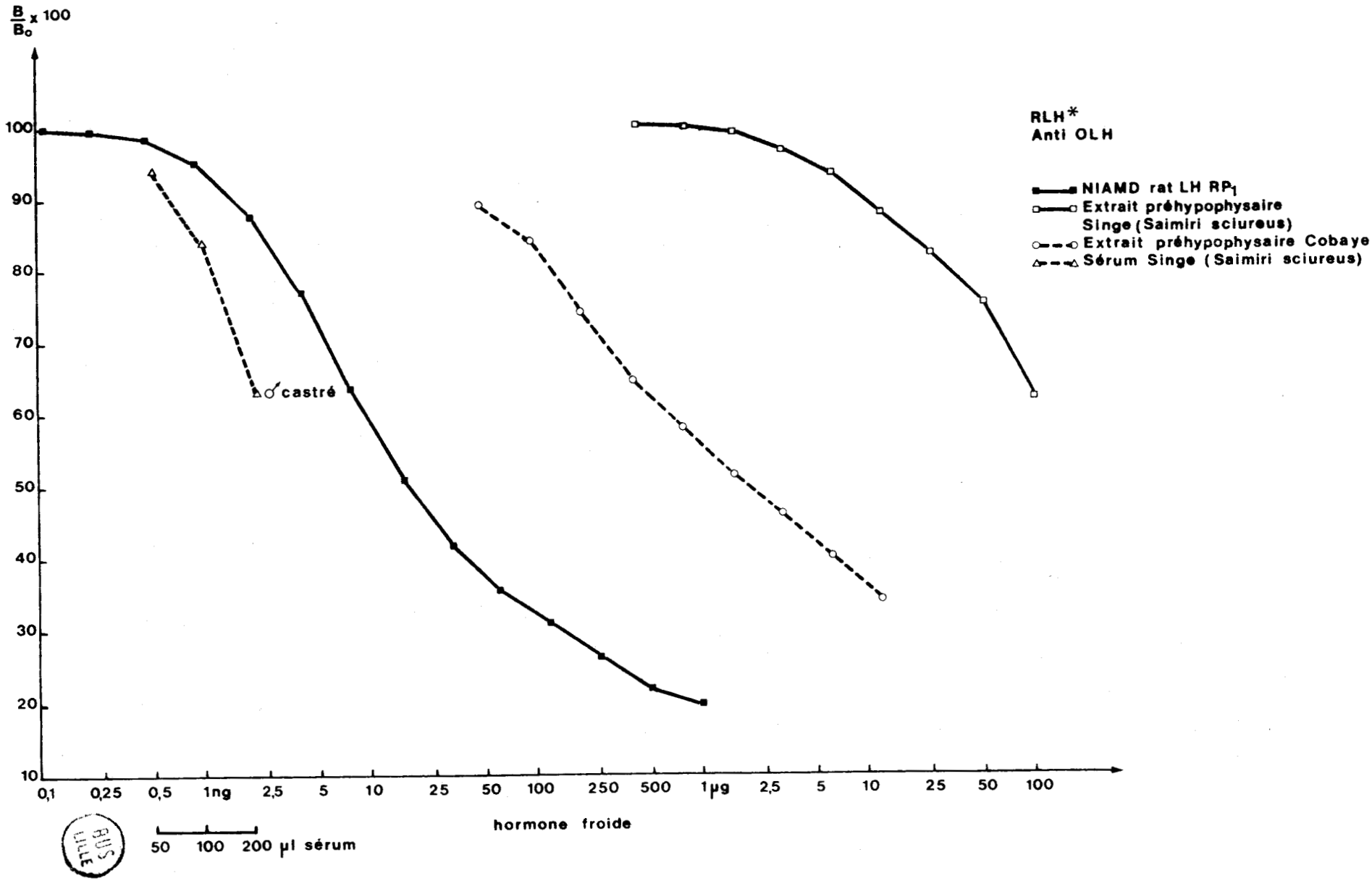


Figure n° 12 : Déplacement de la RLH fixée aux anticorps anti OLH par la RLH non marquée, l'extrait antéhypophysaire de cobaye non purifié et des sérums de cobayes progressivement dilués.

Figure n° 13 : Déplacement de la RLH* fixée aux anticorps anti OLH par la RLH non marquée, les extraits préhypophysaires de cobaye ou de singe et un sérum de singe à différentes dilutions.


B/Bo x 100
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
castré
0,1
0,25
0,5
1ng
2,5
5
10
25
50
100
250
500
1µg
2,5
5
10
25
50
100
hormone froide
50 100 200 µl sérum
RLH*
Anti OLH
NIAMD rat LH RP1
Extrait préhypophysaire Singe (Saimiri sciureus)
Extrait préhypophysaire Cobaye
Sérum Singe (Saimiri sciureus)

BUS LILLE

L'addition d'extrait hypophysaire de cobaye (jusqu'à 25 µg) ou de singe (jusqu'à 200 µg) ne provoque aucune inhibition de la fixation de la HLH marquée aux antisérums anti HLH provenant de Calbiochem ou de l'Institut Pasteur. Ces antisérums possèdent probablement une très grande spécificité d'espèce. Le troisième antisérum, fourni par le C.E.A., a pu être utilisé avec succès ; en effet, dans ce système, l'addition de LH hypophysaire de singe présente une réaction de compétition qui, bien qu'incomplète, provoque 40 à 64 p. 100 d'inhibition lorsque l'on ajoute 50 µg d'extrait non purifié (Fig. n° 14 p. 89).

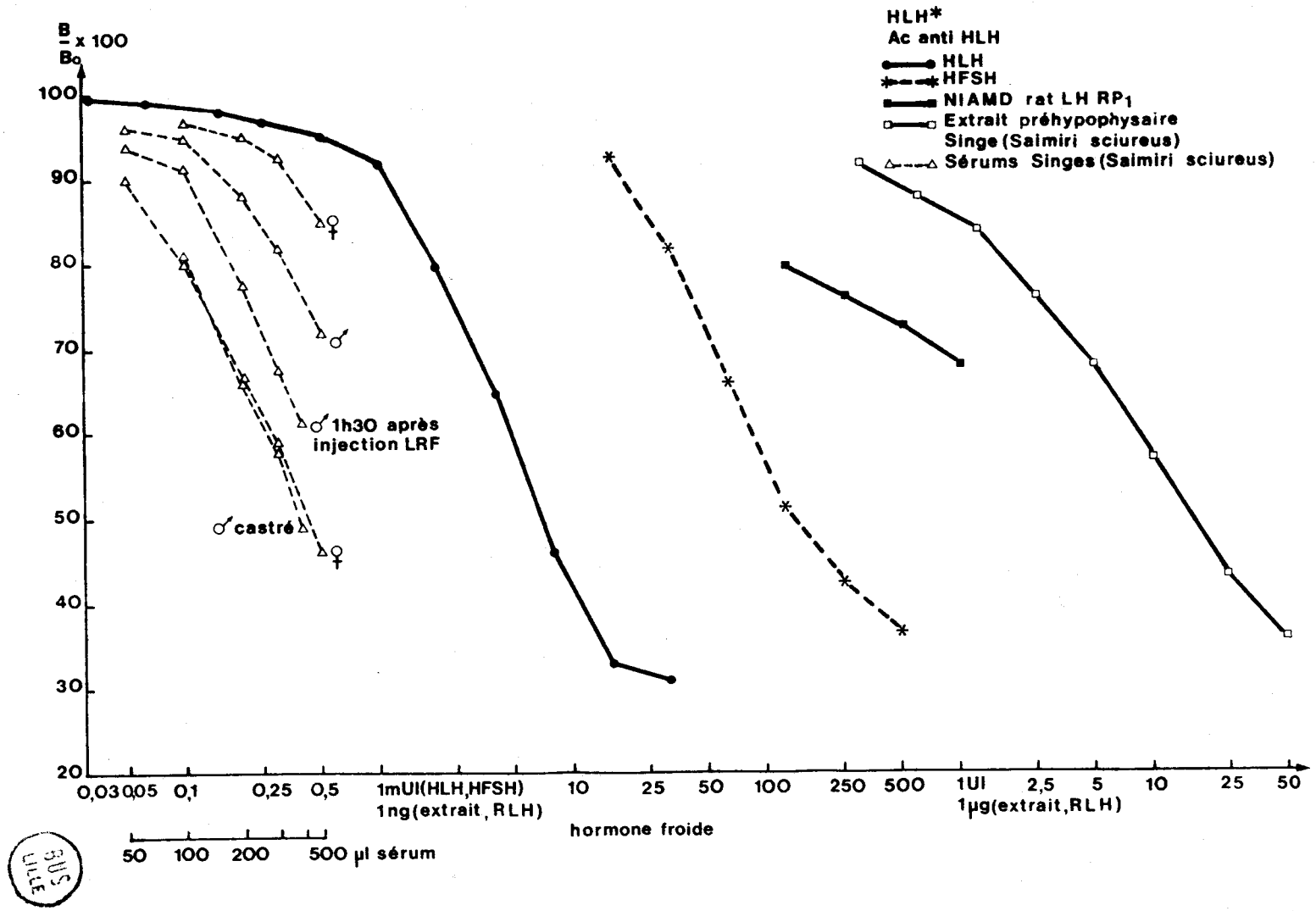
Les courbes obtenues à partir des dilutions des sérums de singes sont parallèles à la courbe de référence humaine (et ceci quelle que soit la concentration en LH du sérum), montrant une identité de réaction de la LH sérique de singe et de la HLH avec l'antisérum anti HLH. Il est possible de détecter 0,5 mUI/ml de LH.

Ce système semble donner de très bons résultats pour le dosage de la LH sérique chez le singe écureuil, c'est donc celui que nous avons adopté.

On peut remarquer que la LH de rat (NIAMD rat LH RP_1) ne présente qu'une réaction croisée très partielle dans ce système, confirmant son manque d'affinité pour l'antisérum anti HLH.

La HFSH entraîne une inhibition de la réaction pour des quantités équivalentes à 18 fois celles de la LH, ceci en raison de sa contamination par la LH.

Figure n° 14 : Déplacement de la HLH* fixée aux anticorps anti HLH par la HLH non marquée, la RLH, la HFSH, un extrait préhypophysaire de singe et des sérums de singes progressivement dilués.


B/Bo x 100
100
90
80
70
60
50
40
30
20
HLH*
Ac anti HLH
HLH
HFSH
NIAMD rat LH RP1
Extrait préhypophysaire Singe (Saimiri sciureus)
Sérums Singes (Saimiri sciureus)
♂ 1h30 après injection LRF
♂ castré
0,03 0,05 0,1 0,25 0,5 1mUI(HLH,HFSH) 10 25 50 100 250 500 1UI 2,5 5 10 25 50
1ng(extrait, RLH)
1µg(extrait, RLH)
hormone froide
50 100 200 500 µl sérum

BUS LILLE

II - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE LA PROGESTERONE ET DU 17 β 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 est calculée, par comparaison à la courbe standard, de la façon suivante :

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

X pg de progestérone/ml de sérum

par exemple, dans nos dosages chez les cobayes normaux :

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

L'interférence avec la 17 α-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, 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 :

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

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 sont choisis, comme pour la progestérone, en fonction de l'état physiologique des animaux.

III - DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DU LRF

L'antisérum anti LRF, utilisé à la dilution finale de 1/32000, permet, dans nos dosages, la fixation de 35 p. 100 du LRF marqué. Cette fixation est plus faible que celle obtenue avec le même antisérum par CARATY et coll. 1980 (50 p. 100 à la dilution finale de 1/150.000), ce qui donne à leurs dosages une sensibilité qui atteint 0,4 pg alors que, dans nos dosages, la sensibilité est de l'ordre de 2 à 3 pg.

Cette différence s'explique par le fait que la purification de leur hormone marquée comporte une étape supplémentaire (électrophorèse en gel de polyacrylamide), éliminant pratiquement complètement le LRF non marqué, probablement principal facteur limitant (après l'affinité de l'antisérum pour l'hormone) pour la sensibilité du dosage.

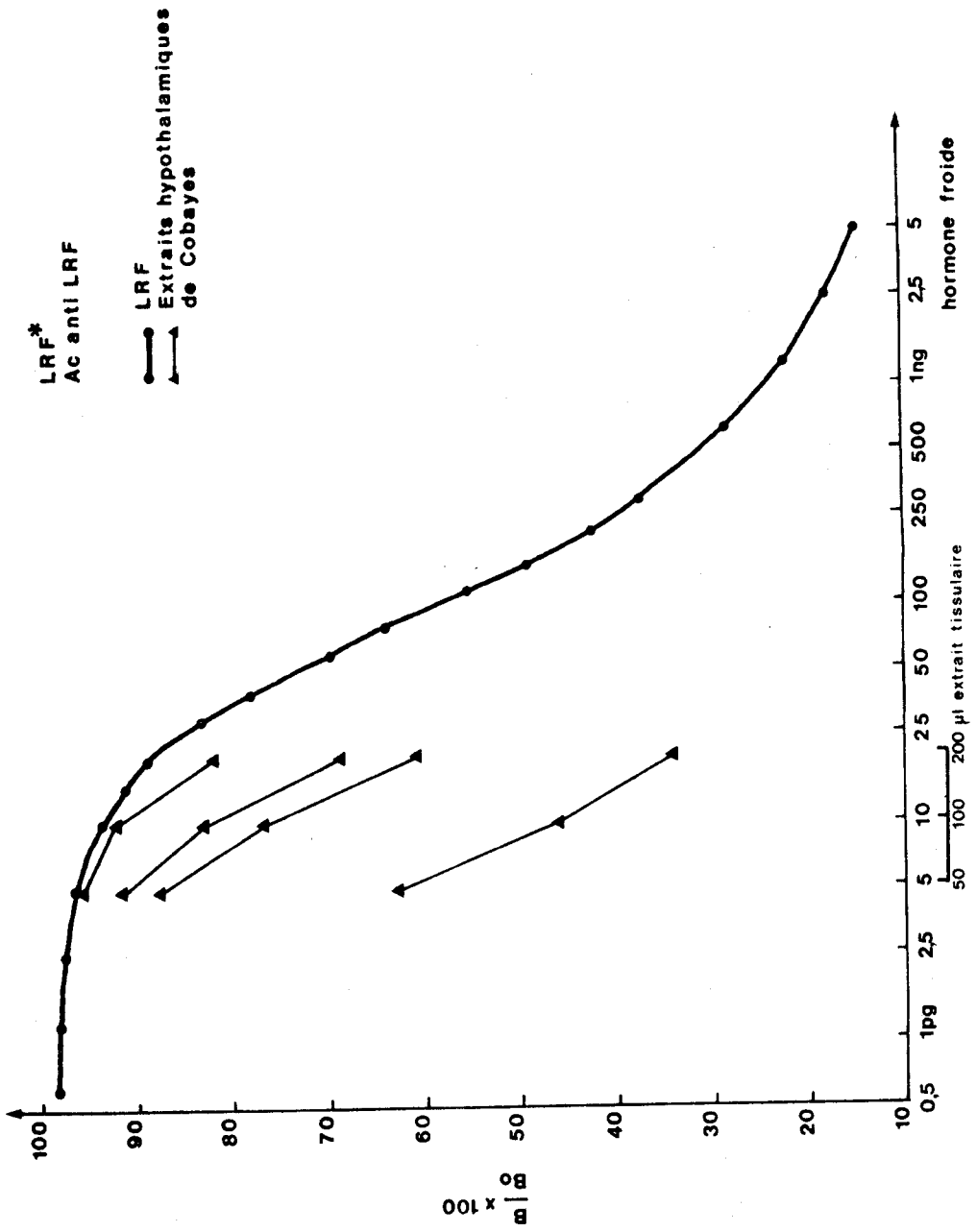
Bien que nous ayons déjà diminué les quantités d'agent oxydant et d'^{125}INa par rapport à NETT et ADAMS 1977, celles que nous utilisons restent cependant plus grandes que celles utilisées par CARATY et coll. (1980), aussi l'hormone marquée que nous obtenons contient, au départ, moins de LRF froid, mais il n'est cependant pas éliminé complètement lors de la chromatographie ; elle contient, en outre, du LRF diiodé qui n'est probablement pas non plus éliminé totalement (mais si ce dernier - encore faudrait-il qu'il soit largement contaminant - peut entraîner une légère surestimation des valeurs lors des dosages dans les extraits tissulaires ou les sérums, il ne semble pas diminuer la sensibilité du dosage : NETT et ADAMS, 1977).

Bien que moins performante, nous avons donc cependant opté pour cette méthode car elle est plus rapide et permet, néanmoins, l'obtention de résultats très corrects pour le dosage du LRF dans les extraits tissulaires.

Les courbes $\frac{B}{B0} \times 100$ correspondant à l'addition de quantités croissantes de LRF non marqué et d'extraits tissulaires sont tracées. Elles sont parfaitement parallèles et ceci aussi bien pour les extraits contenant beaucoup de LRF que pour ceux qui en contiennent moins (Fig. n° 15, p. 93).

Le coefficient de variation intrasystème concernant les mesures du LRF dans les extraits tissulaires à différentes dilutions, a une valeur

Figure n° 15 : Déplacement du LRF* fixé aux anticorps anti LRF par du LRF non marqué et des extraits hypothalamiques de cobayes.


LRF*
Ac anti LRF
LRF
Extraits hypothalamiques
de Cobayes
B/Bo x 100
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0,5
1pg
2,5
5
10
25
50
100
250
500
1ng
2,5
5
hormone froide
50
100
200 µl extrait tissulaire

moyenne de 3,4 p. 100. Tous les échantillons concernant la même expérience ont été introduits dans un même dosage, afin d'éliminer le coefficient de variation intersystème qui est de 5 à 8 p. 100.

IV - DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES DE L'ACTH ET DU CORTISOL

A) Dosage de l'ACTH

La courbe $\frac{B}{BO} \times 100$ en fonction du taux d'ACTH standard introduit est tracée. Les taux d'ACTH contenus dans les échantillons de plasma sont lus sur cette courbe en pg CIS/ml.

La correspondance avec la préparation de référence MRC 74/555 est telle que :

$$1 \text{ pg MRC} = 3,0 \pm 0,3 \text{ pg CIS}$$

Le β 1-24 (synacthène) présente une réaction croisée de 100 p. 100 dans ce dosage ; le fragment 1-16, de 3 p. 100 ; le fragment 11-24, de 1,5 p. 100 ; la β-endorphine, de 1 p. 100 ; les interférences de la LPH, de la MSH, des fragments 1-10 et 25-39 sont négligeables.

En l'absence d'hormone froide, l'antisérum se fixe à raison de 52 p. 100 à l'ACTH marqué.

La sensibilité du dosage est de 10 ± 4 pg/ml.

Le coefficient de variation intraessai a une valeur moyenne de 8 p. 100.

B) Dosage du cortisol

La courbe $\frac{B}{BO} \times 100$ en fonction du taux de cortisol standard introduit est tracée. Les taux de cortisol contenus dans les échantillons de sérums sont lus sur cette courbe en ng/ml.

La conversion dans le système d'unités internationales, c'est-à-dire en nmoles/l est effectuée :

$$\text{nmoles cortisol/l} = \text{ng cortisol/ml} \times \frac{1000}{P.M.}$$

$$\frac{1000}{P.M.} = 2,75$$

Certaines hormones stéroïdiennes peuvent interférer dans ce dosage en entrant en compétition avec le cortisol, principalement la cortexolone (20 p. 100), s'il y a eu traitement à la métopyrone, la 17 α-hydroxyprogestérone (6,2 p. 100) et la progestérone (0,6 p. 100), élevées au terme d'une grossesse ; la corticostérone (2,8 p. 100), la cortisone (1,8 p. 100), la cortexone (1,1 p. 100) ; testostérone, déxaméthasone, dihydrotestostérone, tétrahydrocortisol et cholestérol ne peuvent interférer que pour moins de 1 p. 100.

La fixation du cortisol marqué à l'antisérum, en l'absence de toute hormone froide, est de 58 p. 100. La sensibilité du dosage est de 2,5 $\pm$ 0,7 ng/ml, quantité de cortisol qui entraîne une baisse de 5 p. 100 de la capacité de liaison initiale. Le coefficient moyen de variation intraessai est de 3,2 p. 100 ; le coefficient de variation interessais est de l'ordre de 10 p. 100.

V - EXPRESSION DES RESULTATS CONCERNANT LES VARIATIONS DES TAUX HORMONAUX TISSULAIRES ET SERIQUES ET REPRESENTATION GRAPHIQUE

Dans le texte ou les tableaux, les valeurs sont le plus souvent accompagnées de l'erreur standard de la moyenne :

$$\underset{(S.E.M.)}{Sm} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

On peut alors définir l'intervalle de confiance à 5 p. 100 de risque (P = 0,05), par la méthode de STUDENT-FISHER ; soit la valeur t 0,05 pour (n - 1) degrés de liberté (lue sur la table de FISHER et YATES, p. 98) on assigne à la moyenne inconnue μ, l'intervalle de confiance à 5 p. 100 : $\bar{X} \pm t \times Sm$.

La détermination du degré de signification des variations constatées (d'après la probabilité existant pour que deux mesures soient identiques) est calculée suivant la méthode du test t de STUDENT-FISHER concernant la comparaison de deux séries de mesures (décrite à propos du calcul de la sensibilité des dosages, p.71). Une variation est dite significative si $P \leqslant 0,05$.

Pour l'ensemble des résultats concernant le cycle oestral chez le cobaye, les courbes ont été représentées avec l'amplitude maximale pour chaque valeur : ceci nous a semblé être la représentation la plus apte, surtout, à relater le caractère pulsatile que semblent avoir les sécrétions du LRF et de l'ACTH ; en effet, étant donné qu'il peut y avoir un léger décalage physiologique entre des animaux sacrifiés en principe au même moment du cycle, ce type de sécrétion aurait risqué d'être davantage masqué par la représentation de la moyenne accompagnée de l'erreur standard.

Les courbes concernant le cycle oestral chez le singe écureuil ont, elles, été tracées à l'aide des valeurs moyennes accompagnées de leur erreur standard.

Table de t (d'après FISHER et YATES)

d.d.l. \ P	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
∞	0,126	0,674	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

BUS LILLE

VI - INJECTION DE LRF - CASTRATION

A - Cobayes

1) 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 1 h 30 après l'injection, les valeurs sont alors multipliées par 8. Les taux de testostérone sérique augmentent simultanément mais ne décroissent que plus lentement (Fig. n° 16 p. 100).
1 h 30 après l'injection, on observe également une augmentation des taux de FSH sérique montrant l'action double 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 (CROIX 1976 b).

2) Castration

Après un délai de 48 heures, les taux de LH sérique augmentent de façon significative ($P < 0,05$), passant de 1,7 ± 0,2 ng/ml (n = 16) à 5,2 ± 0,6 ng/ml (n = 10). Après 24 jours de castration, ils se situent entre 30 et 60 ng/ml.

BUS LILLE

L'augmentation des taux de FSH est hautement significative ($P = 0,001$) 24 heures après castration ; ces taux passent de 90 ± 5 ng/ml (n = 15) à 126 ± 18 ng/ml (n = 5). Au 28ème jour, des valeurs de l'ordre de 1000 ng/ml sont atteintes (CROIX 1976 b, 1977 a).

Les courbes obtenues à l'aide des dilutions des sérums enrichis en LH et en FSH par l'administration de LRF ou par la castration sont parallèles aux courbes de références de rat correspondantes (Fig. n° 12, p. 86 et Fig. n° 6, p. 76). Elles confirment la compétition complète produite par les gonadotrophines sériques du cobaye dans les systèmes de dosages radio-immunologiques que nous utilisons (CROIX 1976 b, 1977 b).

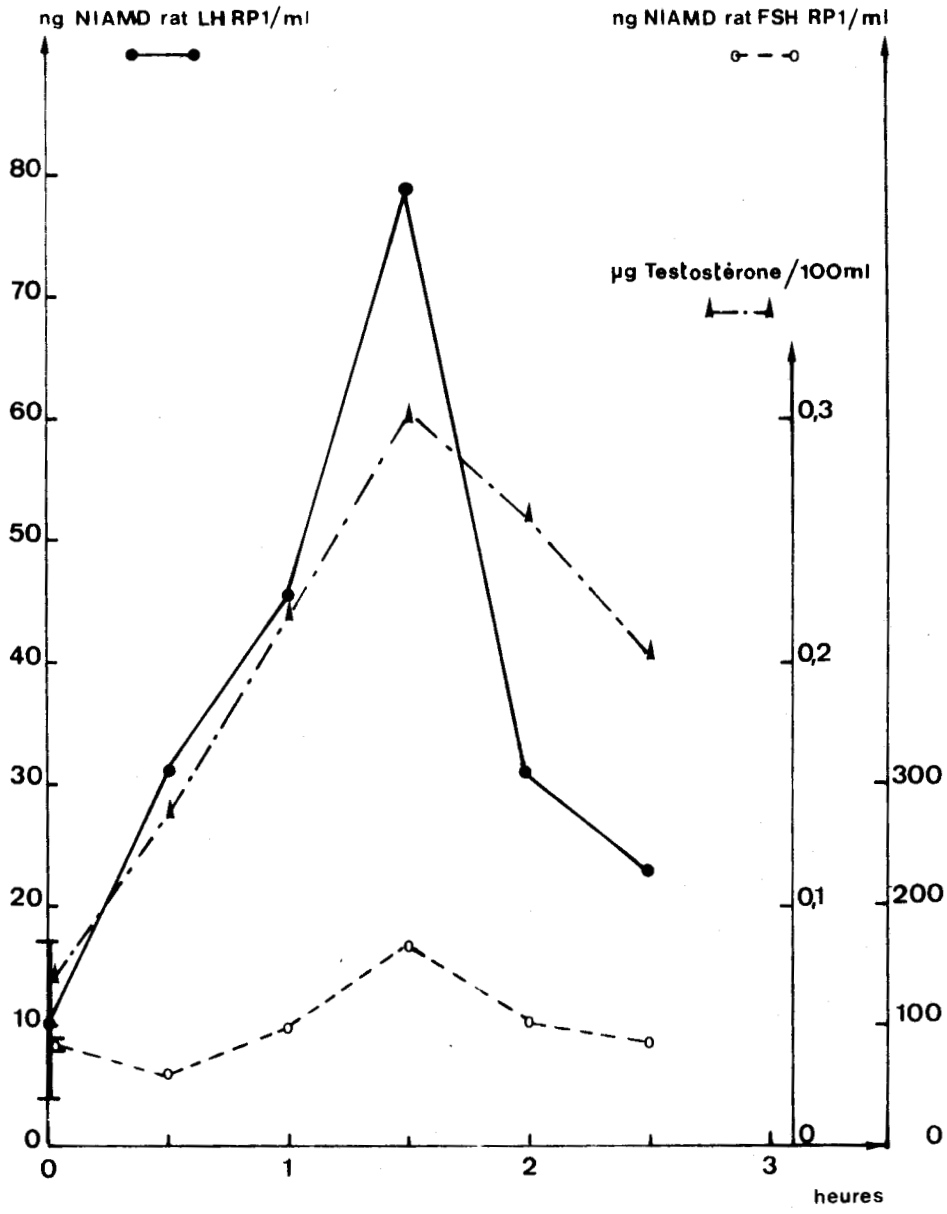


Figure n° 16 : Effet de l'injection intrapéritonéale de LRF synthétique sur les taux sériques de LH, de FSH et de testostérone chez le cobaye mâle.

B - Singes écureuils

1) Injection de LRF

Après injection de LRF synthétique, les taux sériques de LH, chez le singe écureuil mâle adulte, passent de 8,3 ± 1,1 mUI/ml (n = 8) à 12,7 ± 3,3 mUI/ml (n = 5) ($P < 0,2$) ; les taux de FSH passent de 3,8 ± 0,8 mUI/ml (n = 8) à 6,9 ± 0,6 mUI/ml (n = 5) ($P < 0,01$).

2) Castration

15 jours après castration, les taux des gonadotrophines sériques, chez le singe mâle adulte, atteignent des valeurs voisines de 19 mUI/ml en LH et de 8,5 mUI/ml en FSH.

Les courbes obtenues à partir des dilutions de ces sérums sont parallèles à celles des hormones humaines correspondantes dans les systèmes homologues humains que nous utilisons (Fig. n° 14, p. 89 et Fig. n° 9, p. 81).

VII - CYCLE OESTRAL DU COBAYE

A - LH

1) LH sérique :

Les taux moyens de la LH sérique déterminés pendant la période dioestrale sont équivalents à des taux de NIAMD rat LH RP_1 se situant entre 3 et 10 ng/ml. Une légère augmentation des taux de LH peut être observée en début de prooestrus II (passage significatif, $P < 0,01$, de 3,2 ± 1,0 ng/ml à 9,5 ± 0,7 ng/ml), simultanément au premier pic préovulatoire de LRF (Tableau VI, p. 103). Un pic très net de LH a lieu lors de l'oestrus préovulatoire : il s'agit d'une décharge importante qui atteint des valeurs moyennes de 50 à 100 ng/ml et qui semble être de courte durée. Après l'ovulation, pendant la période du postoestrus I et le début du postoestrus II, les taux de LH ont des valeurs plus élevées que pendant la période du dioestrus, se situant le plus souvent entre 10 et 25 ng/ml. (fig. n° 17, p. 104 et fig. n° 18, p. 105).

2) LH préhypophysaire :

Juste après la décharge préovulatoire de LRF, les taux de LH hypophysaire, qui étaient de 32,0 ± 3,3 µg/hypophyse, passent à des valeurs moyennes de 52 ± 2 µg,puis 120 ± 10 µg (Tableau VI, p. 103). Ces taux chutent à 39 ± 13 µg (puis 14,7 ± 3,0 µg) au moment du pic de la LH sérique (lorsque les concentrations de cette dernière, de 11,8 ± 0,2 ng/ml s'élèvent à 98 ± 26 ng/ml).

TABLEAU VI : LH, FSH et Progestérone au cours du cycle oestral, chez le cobaye.

	LH		FSH		Progestérone	
	antéhypophysaire µg/hypophyse	sérique ng/ml	antéhypophysaire µg/hypophyse	sérique ng/ml	sérique ng/ml ± S.E.M.	n
Prooestrus	29,5 ± 4,2	4,9 ± 0,9	9,9 ± 1,9	35,2 ± 8,2	2,0 ± 0,4	8
I	49,7 ± 14,6	3,2 ± 1,0	12,3 ± 7,7	46 ± 19	3,1 ± 0,3	3
Prooestrus	30,7 ± 6,2	9,5 ± 0,7	10,8 ± 0,1	45,7 ± 11,4	2,0 ± 0,4	4
II	31,4 ± 3,3	7,1 ± 1,3	9,0 ± 0,7	35,6 ± 2,8	2,0 ± 0,3	19
Oestrus	32,0 ± 3,3	6,5 ± 1,5	9,6 ± 1,9	25 ± 4,6	2,2 ± 0,4	16
	52,0 ± 2,0 120 ± 10	11,8 ± 0,2	6,2 ± 0,4	17,5 ± 2,5	2,7 ± 0,5	4
	39 ± 13	97,5 ± 25,6	8,6 ± 1,8	23,5 ± 0,1	5,1 ± 0,3	4
	14,7 ± 3,0	64,0 ± 18,8	4,0 ± 1,3	51 ± 7	9,9 ± 0,8	7
Ovulation	19,7 ± 9,4	4,9 ± 1,8	7,3 ± 1,2	55,7 ± 2,3	3,1 ± 0,4	10
Postoestrus I	41,4 ± 15,5	7,9 ± 3,2	7,9 ± 1,1	62,8 ± 11,7	1,8 ± 0,3	6
	30,7 ± 3,7	14,9 ± 5,6	10 ± 2,2	140 ± 30	1,8 ± 0,3	11
	30,3 ± 7,4	10,6 ± 2,6	8,3 ± 1,0	144,5 ± 14,8	4,8 ± 1,3	4
	21,1 ± 6,6	6,3 ± 3,3	11,7 ± 2,2	173,0± 22,5	3,2 ± 0,7	5
Postoestrus II	37,0 ± 7,0	11,1 ± 7,5	9 ± 1	120,3 ± 15,8	3,5 ± 1,4	3
	31,0 ± 8,0	5,4 ± 2,1	10,3 ± 1,3	81,7 ± 21,7	5,8 ± 2,3	3
5 jours	23,5 ± 5,5	10,0 ± 0,1	8,7 ± 0,7	80 ± 10	7,9 ± 0,9	2
6 jours	43,7 ± 6,0	3,1 ± 0,6	15,5 ± 2,9	50 ± 26	5,6 ± 2,8	4
8 jours	38,7 ± 4,7	4,7 ± 2,5	11,2 ± 2,1	86 ± 9	9,4 ± 0,7	5
13 jours	34,2 ± 6,9	8,1 ± 0,9	14,4 ± 4,9	29,0 ± 4,6	7,0 ± 1,5	3

BUS LILLE

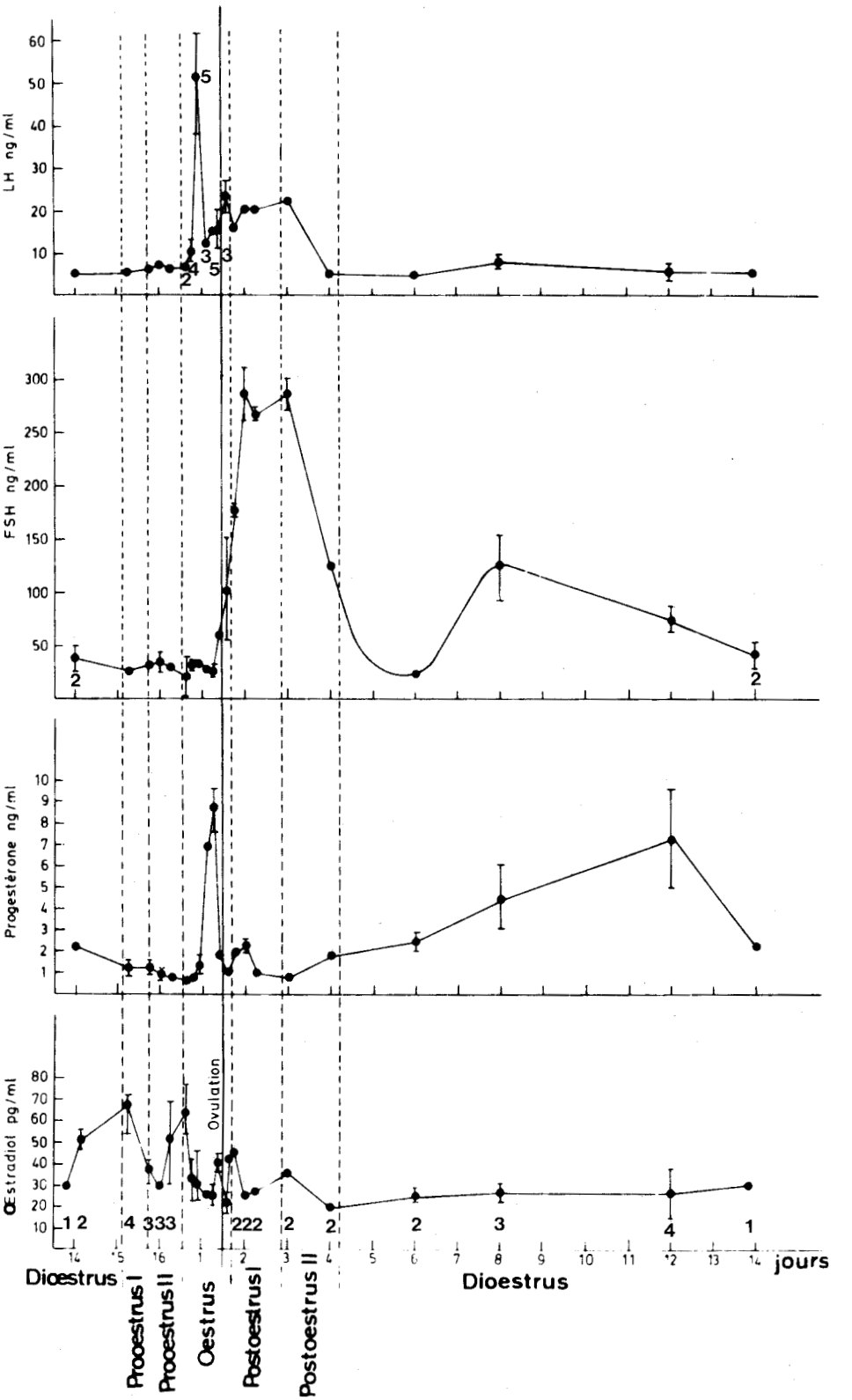
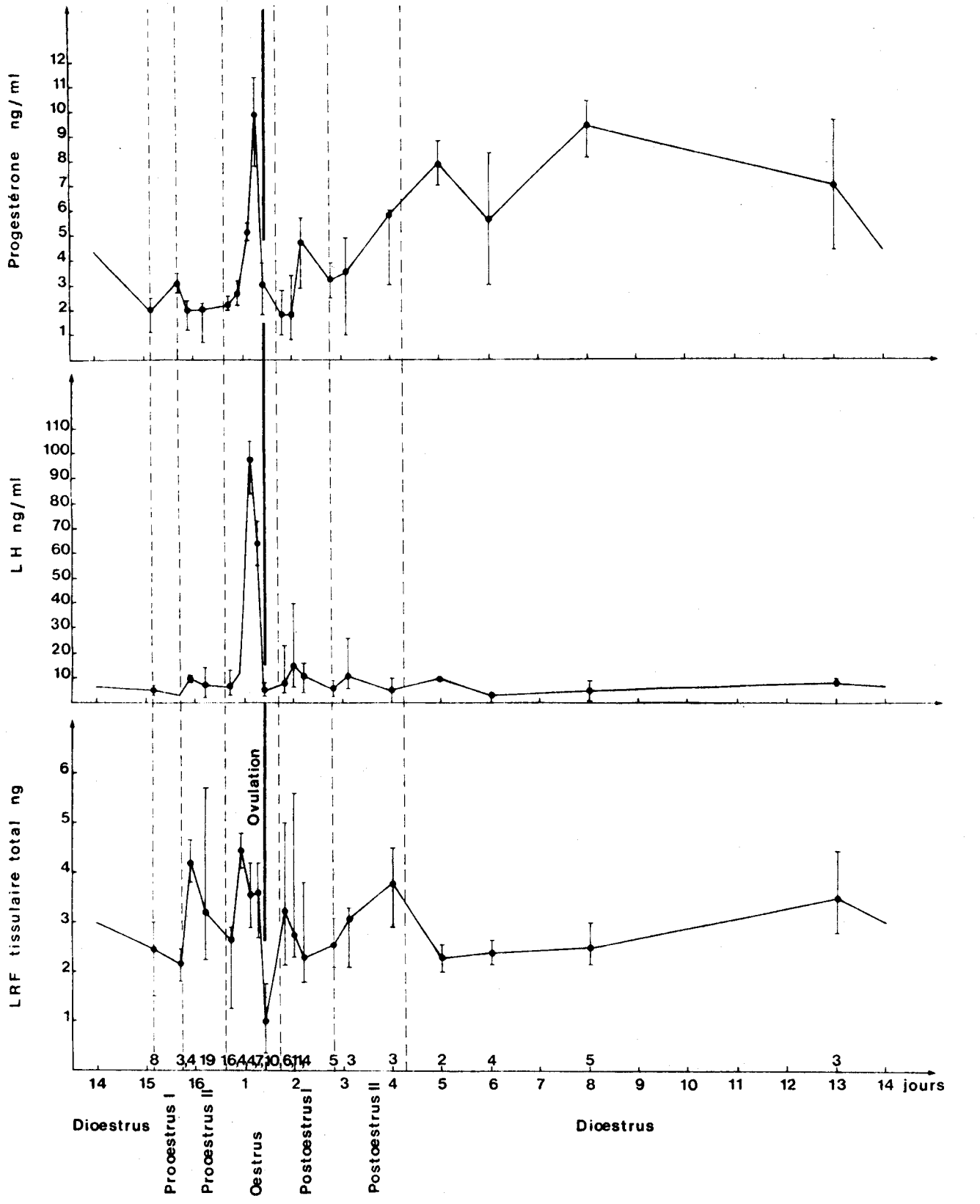


Figure n° 17 : Modifications des taux de LH, de FSH, de progestérone et de 17 β oestradiol sériques, chez le cobaye, au cours du cycle oestral. Les barres verticales représentent l'amplitude. Le nombre d'animaux sacrifiés pour chaque stade est indiqué.

BUS LILLE

Figure n° 18 : Modifications des taux de progestérone et de LH sériques ainsi que des taux du LRF tissulaire total, chez le cobaye, au cours du cycle oestral. Les barres verticales représentent l'amplitude.


Progestérone ng/ml
LH ng/ml
LRF tissulaire total ng
Ovulation
8 3 4 19 16 4 4 7 10 6 11 4 5 3 3 2 4 5 3
14 15 16 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 jours
Dioestrus
Proœstrus I
Proœstrus II
Œstrus
Postœstrus I
Postœstrus II
Dioestrus

BIUS LILLE

B - FSH

1) FSH sérique

Les taux moyens de la FSH sérique en fin de dioestrus et en prooestrus sont équivalents à 25 à 46 ng/ml de NIAMD rat FSH RP_1. Au moment du maximum du pic préovulatoire de la LH sérique, les taux de FSH sont encore bas (23,5 ± 0,1 ng/ml). Un pic très important de FSH débute peu avant l'ovulation et atteint des valeurs maximales en moyenne de 173 à 280 ng/ml, en postoestrus I et en début de postoestrus II (les concentrations en LH sont alors assez importantes mais ne sont pas comparables à celles atteintes lors du pic préovulatoire). Au 6ème jour du cycle, les taux de FSH se situent à nouveau entre 20 et 50 ng/ml, puis ils reprennent des valeurs élevées avec un maximum de 86 à 120 ng/ml au 8ème jour. (fig. n° 17, p. 104, tableau VI p. 103).

Il faut remarquer que les valeurs minimales que nous avons obtenues pour la FSH sérique, chez le cobaye, au cours du cycle oestral (CROIX et FRANCHIMONT 1975) sont en moyenne 4 fois moins élevées que celles trouvées par BLATCHLEY et coll. 1976 (utilisant le système de dosage homologue de rat décrit par DONOVAN et coll. 1975 b) ; les valeurs maximales sont du même ordre de grandeur, aussi, les variations que nous avons obtenues sont nettement plus accusées que celles décrites par ces auteurs.

Cette différence dans les résultats peut provenir de la meilleure sensibilité de notre dosage. En effet, dans le système décrit par DONOVAN et coll. 1975 b, l'addition d'une plus grande quantité d'hormone froide prise pour référence (NIAMD rat FSH RP_1) est nécessaire pour parvenir à induire une diminution de la radioactivité fixée aux anticorps ; (pour une diminution de 50 p. 100, ils doivent introduire une quantité de ce standard double de celle que nous utilisons) ; en outre, les courbes qu'ils obtiennent à partir de dilutions de sérums de cobayes riches en FSH ne sont pas tout à fait parallèles à celles du standard de rat. Ces éléments conduisent fort probablement à une surestimation des valeurs, atténuée cependant pour les échantillons dont la concentration en FSH est assez forte.

Nous avions également donné (CROIX, 1976 a) une évaluation des taux de la FSH sérique 3 à 4 fois moins élevée que DONOVAN et coll. (1975 b) chez les cobayes au cours de la période postnatale, avec également des variations plus marquées.

Si la FSH sérique commence à s'élever peu avant l'ovulation, il n'y a cependant pas, chez le cobaye, de pic préovulatoire de FSH coïncidant avec ceux de la LH et de la progestérone ; ce fait que nous avions décrit (CROIX et FRANCHIMONT 1975) a été confirmé par BLATCHLEY et coll. 1976.

2) FSH préhypophysaire :

Les taux moyens de la FSH hypophysaire, dosable par radio-immunologie, en dioestrus et en prooestrus, sont de 10,6 ± 0,3 µg/hypophyse (Tableau VI, p. 103). En oestrus préovulatoire, au moment du démarrage de la cession de la FSH dans le sang, la quantité de FSH hypophysaire tombe à 4,0 ± 1,3 µg ; mais très vite, avant même que la concentration sérique n'atteigne son maximum, la FSH hypophysaire reprend sa valeur initiale (elle est à 7,3 ± 1,2 µg au moment de l'ovulation et à 10,0 ± 2,2 µg en postoestrus I).

C - Progestérone

Durant le prooestrus, les concentrations moyennes de la progestérone sérique sont de 0,8 à 2 ng/ml de sérum. Elles peuvent augmenter légèrement (3,1 ± 0,3 ng/ml) en fin de prooestrus I, juste avant le premier pic de LRF hypothalamique ; elles retombent aussitôt (2,0 ± 0,4 ng/ml) au moment de ce pic de LRF (Tableau VI, p. 103). Cette première montée de progestérone est très faible ($P < 0,2$) mais elle a peut-être un rôle dans l'induction de la première mise en charge des cellules à LRF. Elle semblerait simultanée à une baisse également temporaire des taux d'oestradiol circulant.

Il existe un pic important de progestérone, atteignant des valeurs voisines de 10 ng/ml, lors de l'oestrus préovulatoire. Ce pic débute simultanément à la décharge brève et importante de LH dans le sang et atteint son maximum lorsque les taux de LH sont déjà en phase décroissante. Les coupes des ovaires montrent alors des follicules de DE GRAAF dont l'ovocyte est en métaphase de 2 nde division (Planche VI, p.109). Lors de l'ovulation, les taux de progestérone tombent à 3-1 ng/ml. Par la suite, on peut observer un second pic de plus faible importance (2,5-4,8 ng/ml), en début de postoestrus I lorsque les taux de LH sont le plus souvent assez élevés. Enfin, dès le postoestrus II, la concentration moyenne de progestérone sérique augmente progressivement pour atteindre des valeurs de l'ordre de 7 à 9,4 ng/ml entre le 8ème et le 12ème jour, puis elle diminue (fig. n° 17, p. 104 et fig. n° 18, p. 105).

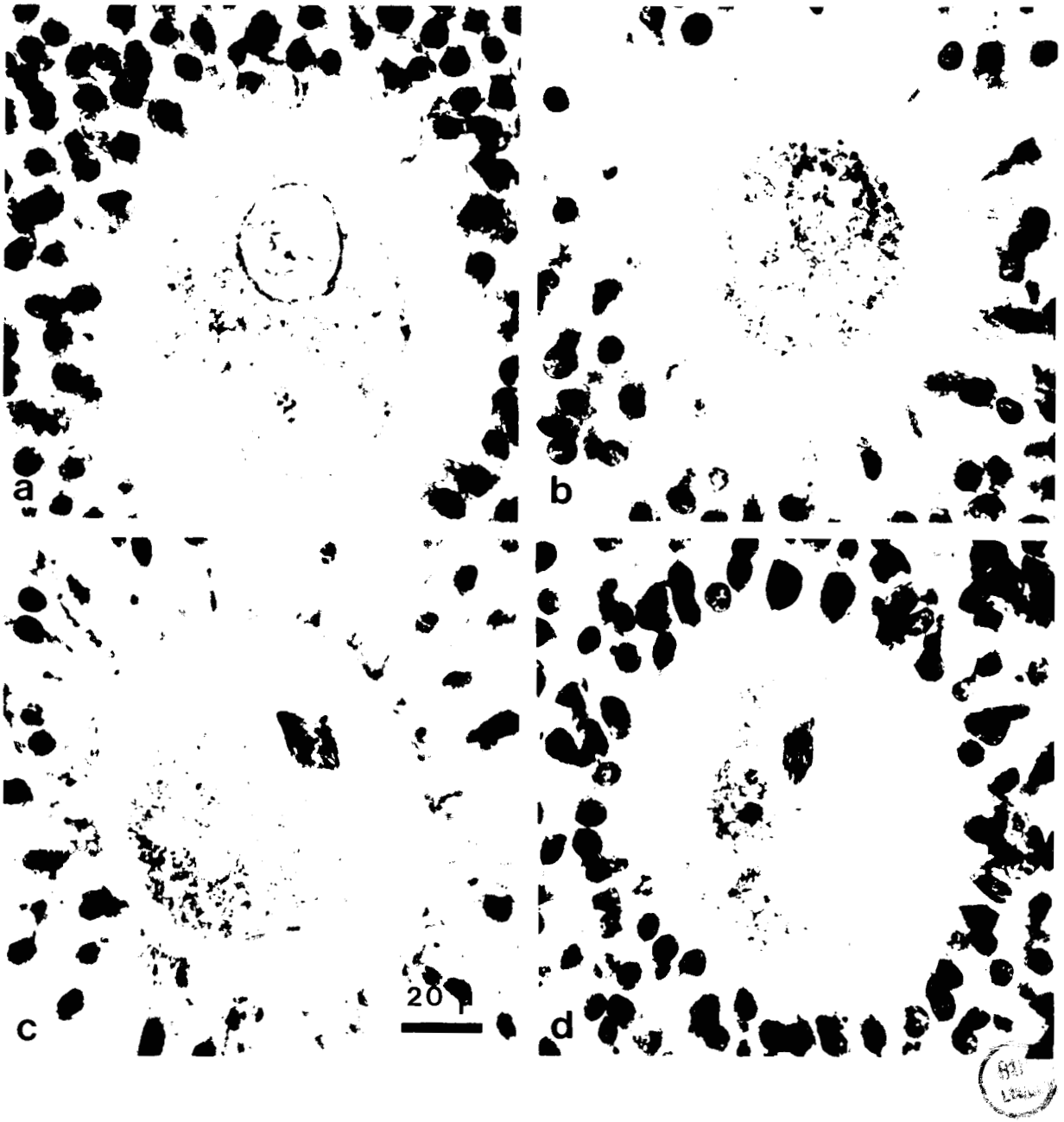
Les valeurs que nous donnons (CROIX et FRANCHIMONT, 1975) sont en moyenne 11 fois plus faibles, pour les valeurs maximales, que celles trouvées par JOSHI et coll. (1973) dans le sérum prélevé au niveau de la veine ovarienne ; ces auteurs n'avaient pas suivi les valeurs jour par jour, mais avaient sélectionné 4 périodes du cycle.

Nous trouvons toutefois des taux 2,5 fois supérieurs (aussi bien pour les valeurs minimales que pour les valeurs maximales) à ceux décrits par FEDER et coll.1968 et BLATCHLEY et coll. 1976. De même que FEDER et coll. 1968, nous observons un pic préovulatoire de progestérone nettement marqué, alors que BLATCHLEY et coll. 1976 le décrivent le plus souvent assez faible.

Planche VI :

a - b : Ovocyte des follicules de De Graaf dans les ovaires des cobayes au moment de la décharge préovulatoire de LH (cyte I : prophase).

c - d : Ovocyte des follicules de De Graaf dans les ovaires des cobayes au moment de la décharge préovulatoire de progestérone (cyte II : métaphase).


a
b
c
d
20

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 β-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 β-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° 17, p. 104).

Des taux d'oestradiol généralement peu élevés chez le cobaye (10-15 pg/ml) ainsi que des variations individuelles importantes de ces taux à un même moment du cycle oestral, avaient déjà été constatées par CHALLIS et coll. 1971.

JOSHI et coll. 1973, dans le sang de la veine ovarienne, observent des taux maximum d'oestradiol, en prooestrus, 2,7 fois supérieurs à ceux que nous décrivons alors (CROIX et FRANCHIMONT 1975) dans la circulation générale.

E - LRF

Les variations des taux du LRF tissulaire durant le prooestrus, l'oestrus et le début du postoestrus (fig. n° 18, p. 105), traduisent la façon pulsatile dont s'effectuent les décharges. Ces taux oscillent en moyenne entre 2,5 et 4,5 ng/animal et peuvent atteindre 5,7 ng. Au moment du pic préovulatoire de LH, ils sont voisins de 3,6 ng. Au moment de l'ovulation ils chutent à 1 ng (0,35 - 1,75). En oestrus postovulatoire et en début de postoestrus, il se produit encore quelques décharges importantes et les taux peuvent atteindre 5 à 5,6 ng puis, durant la fin du postoestrus et le dioestrus, ils auront des valeurs de l'ordre de 2 à 3 ng avec, déjà en fin de dioestrus, des valeurs qui peuvent être plus importantes et approcher 4,5 ng.

Sur le tableau n° VII, p. 113, nous observons chez 4 animaux, des taux importants du LRF hypothalamique en début de prooestrus II (passant de 2,15 $\pm$ 0,32 ng/animal en fin de prooestrus I à 4,20 $\pm$ 0,25 ng/animal, $P < 0,01$), avec un facteur d'augmentation de 2,5 pour l'hypothalamus antérieur et l'OVLT et de 1,9 pour l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane par rapport à la fin du prooestrus I. Aucune augmentation sensible n'est alors observée dans la posthypophyse (Ceci peut correspondre à un démarrage d'accélération de synthèse du LRF ou de sa transformation en une forme dosable par radio-immunologie). En fin de prooestrus II, les taux ne sont plus aussi élevés ; il ne semble donc pas y avoir eu un stockage important ; il est possible que la synthèse ait été ralentie ou qu'un nouvel équilibre se soit établi entre synthèse et excrétion et,ou dégradation.

Les taux maximums de LRF sont observés en oestrus (4,78 $\pm$ 0,03 ng/animal) ; comme précédemment, l'augmentation s'effectue aussi bien dans l'hypothalamus antérieur que dans l'hypothalamus médiobasal ; on note, en outre, chez 3 animaux, des taux relativement importants dans la posthypophyse (1,03 $\pm$ 0,07 ng alors qu'auparavant, ils ont une valeur moyenne de 0,25 ng) ; ceci pourrait être le signe d'une brusque expulsion du LRF vers les terminaisons axoniques et probablement d'une excrétion accompagnant une accélération importante de la synthèse ; brusque vidange nécessaire au déclenchement du pic préovulatoire de LH, en effet, ces taux maximums du LRF sont atteints juste avant que l'on n'observe une augmentation des taux de LH dans l'antéhypophyse puis dans le sérum (fig. n° 18, p. 105). Jusqu'à l'ovulation, les taux de LRF sont maintenus élevés dans l'hypothalamus (mais non dans la posthypophyse) ; il s'est probablement, à nouveau, produit un équilibre entre synthèse et sécrétion.

TABLEAU VII : LRF tissulaire au cours du cycle oestral, chez le cobaye.

pg/animal ± S.E.M.	zone para-olfactive 1	hypothalamus antérieur 2	1 + 2	hypothalamus médiobasal 3
Prooestrus I	243 ± 110	431 ± 89	674 ± 188	1486 ± 516
	71 ± 51	282 ± 12	353 ± 84	1325 ± 175
Prooestrus II	383 ± 92	700 ± 84) 2,5	1083 ± 149) 3	2467 ± 117) 1,9
	180 ± 43	440 ± 57) 1,6	620 ± 88) 1,7	{ 1719 ± 239) 1,4
Oestrus	150 ± 19	440 ± 82	590 ± 78 1,7 {	1480 ± 265
	330 ± 120	1,9 { 660 ± 80) 1,5	990 ± 120) 1,7	2350 ± 50) 1,6
	485 ± 97	{ 820 ± 117	1305 ± 163	2150 ± 113
	315 ± 65	480 ± 80	795 ± 145	2325 ± 98
	250 ± 64	619 ± 45	869 ± 109	2100 ± 265
Ovulation	20 ± 16	140 ± 60) 4,4	160 ± 94) 5,4	720 ± 367) 2,9
Postoestrus I	252 ± 132	646 ± 445) 4,6	898 ± 483) 5,6	{ 1250 ± 276) 1,7
	170 ± 51	503 ± 123	673 ± 89 2,5 {	1794 ± 298
	86 ± 38	293 ± 105	379 ± 200	1167 ± 109
	184 ± 47	384 ± 126	568 ± 152	1350 ± 494
Postoestrus II	58 ± 29	231 ± 89	289 ± 59	1285 ± 697
	379 ± 79	387 ± 173	766 ± 252	2290 ± 642
5 jours	50 ± 25	432 ± 284	482 ± 118	1350 ± 150
6 jours	140 ± 48	375 ± 94	515 ± 135	1600 ± 320
8 jours	104 ± 36	207 ± 54	311 ± 75	1660 ± 371
13 jours	415 ± 9	238 ± 156	653 ± 153	1950 ± 229

BIIS LILLE

posthypophyse 6	3 + 6	mésencéphale 4	T	n
222 ± 102	1708 ± 563	225 ± 60	2607 ± 784	8
332 ± 236	1657 ± 158	140 ± 80	2150 ± 322	3
283 ± 144	2750 ± 125)1,7	372 ± 12	4205 ± 254)1,95	4
228 ± 62	1947 ± 269)1,4	240 ± 44	2807 ± 455)1,5	19
190 ± 65	1670 ± 265	273 ± 70	2533 ± 369	16
1030 ± 70)5,4	3380 ± 20)2	410 ± 130	4780 ± 30)1,9	3
94 ± 26)11	2244 ± 125	550 ± 82	4099 ± 510	3
119 ± 36	2444 ± 942	313 ± 16	3552 ± 1244	4
270 ± 75	2370 ± 328	342 ± 75	3581 ± 440	7
160 ± 153)1,7	880 ± 430)2,7	119 ± 69	1159 ± 587)3,1	10
150 ± 68	1400 ± 320	958 ± 780	3256 ± 1529	6
340 ± 178	2134 ± 322	266 ± 42	3073 ± 407	11
90 ± 36	1257 ± 146	230 ± 85	1866 ± 33	4
409 ± 218	1759 ± 608	221 ± 87	2548 ± 818	5
260 ± 189	1545 ± 886	244 ± 64	2078 ± 1010	3
142 ± 79	2432 ± 708	548 ± 58	3746 ± 535	3
156 ± 124	1506 ± 27	290 ± 180	2278 ± 272	2
150 ± 51	1750 ± 350	273 ± 45	2538 ± 363	4
213 ± 64	1873 ± 317	298 ± 12	2482 ± 270	5
550 ± 144	2500 ± 294	150 ± 71	3303 ± 493	3

BUS LILLE

Au moment de l'ovulation, peu après le pic de progestérone sérique, le LRF total chute à 1,159 ± 0,587 ng, P < 0,01 (chez 10 animaux), valeur la plus basse observée au cours du cycle. Cette chute s'effectue aussi bien dans l'hypothalamus antérieur que dans l'hypothalamus médiobasal mais, là encore, elle est proportionnellement plus accusée dans l'hypothalamus antérieur (baisse respectivement d'un facteur 4,4 et d'un facteur 2,9) ; on ne constate pas de variation simultanée très accusée du LRF posthypophysaire ; il y a probablement arrêt de synthèse et,ou dégradation massive.

Après l'ovulation, le LRF hypothalamique réaugmente (multiplication par un facteur 4,6 dans l'hypothalamus antérieur et 1,7 à 2,5 dans l'hypothalamus médiobasal) puis il se stabilise.

Au cours du cycle, les variations du LRF des zones rostrales (fractions 1 et 2) s'effectuent dans le même sens que celles du LRF contenu dans l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane (et posthypophyse), (fractions 3 et 6) et sont parfaitement simultanées (fig. n° 19, p. 115).

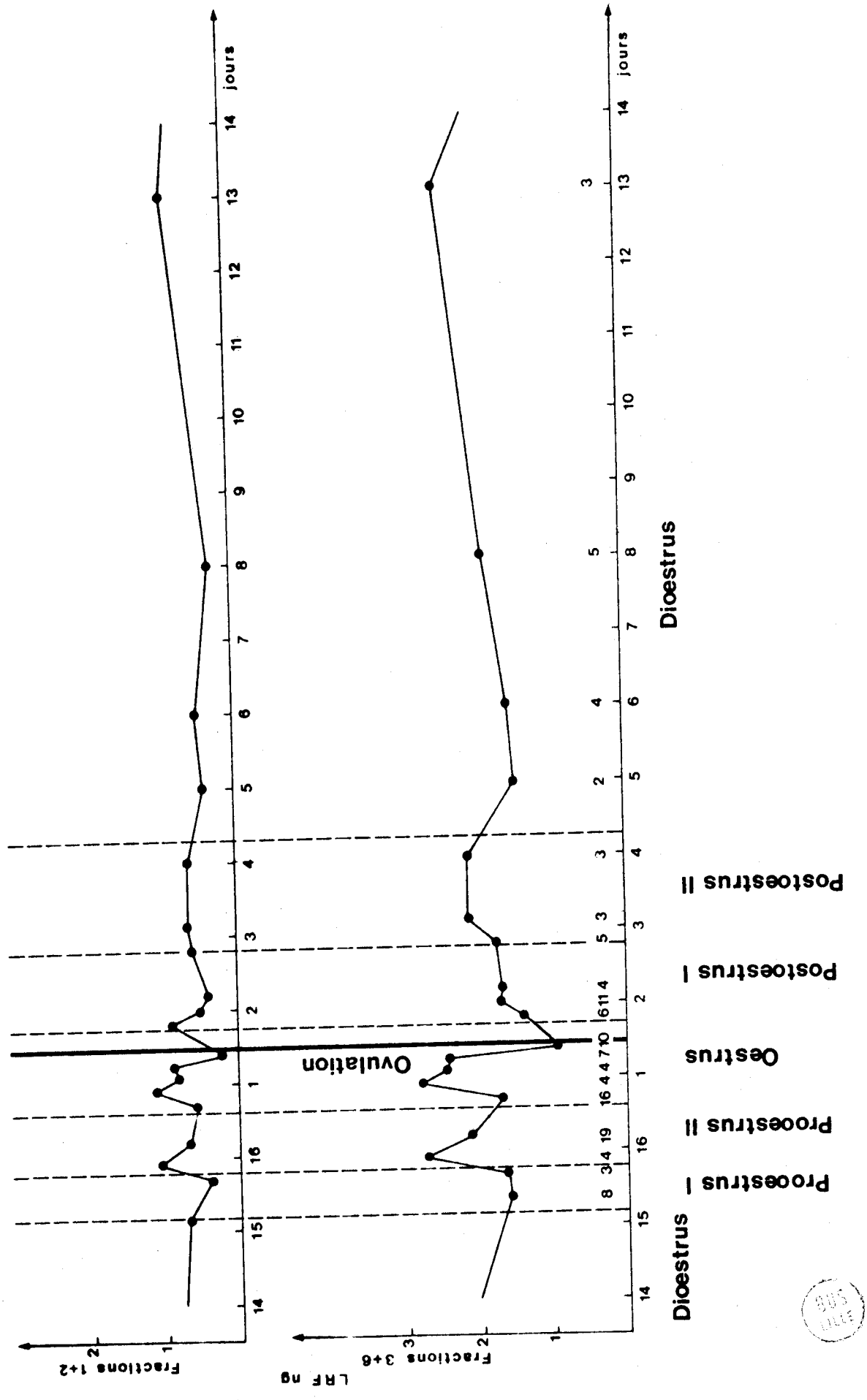
Concernant la mise en charge des neurones à LRF suivant leur topographie, plusieurs cas peuvent être évoqués :

1°) Si les cellules de l'hypothalamus médiobasal ne sont pas impliquées dans la sécrétion cyclique de la LH et élaborent une quantité assez constante de LRF, l'élévation des taux observée dans cette région serait due en totalité à l'augmentation de charge des fibres provenant des neurones de l'hypothalamus antérieur et se projettant dans l'éminence médiane.

a. En supposant que tous les neurones à LRF de l'hypothalamus antérieur intéressés dans la sécrétion cyclique de la LH sont alors activés dans les mêmes proportions et que l'effet de cette activation provoque une augmentation du LRF, d'un facteur 2,5, relativement uniformément répartie, le LRF en provenance de l'hypothalamus antérieur représenterait, avant activation, 57 p. 100 du LRF total de l'hypothalamus médiobasal ; il serait égal en moyenne à 2,7 fois la quantité contenue dans l'hypothalamus antérieur et correspondrait à une fraction égale à 73 p. 100 du LRF total contenu dans l'ensemble des neurones originaires de l'hypothalamus antérieur.

b. Il se pourrait alors que l'augmentation du LRF constatée dans l'hypothalamus médiobasal en prooestrus II (de 1,325 ± 0,175 ng à 2,467 ± 0,117 ng) (P < 0,01)

Figure n° 19 : Modifications des taux de LRF tissulaire au cours du cycle oestral, chez le cobaye, dans l'hypothalamus antérieur (fractions 1 + 2) et l'hypothalamus médiobasal et la posthypophyse (fractions 3 + 6).


Fractions 1+2
Fractions 3+6
LRF ng
jours
Ovulation
Dioestrus
Prooestrus I
Prooestrus II
Oestrus
Postoestrus I
Postoestrus II
Dioestrus

corresponde essentiellement à la mise en charge de neurones rostraux, suivie d'un retour à l'activité normale de base de ces neurones en début d'oestrus (1,480 ± 0,265 ng) et que l'augmentation constatée simultanément en prooestrus II dans l'hypothalamus antérieur (de 0,282 ± 0,012 ng à 0,700 ± 0,084 ng) ($P < 0,01$) soit, d'une part le fait de l'activation momentanée de ces neurones, d'autre part celui de l'activation des neurones du tractus préoptico-terminal, activation qui pourrait, elle, se maintenir jusqu'à l'ovulation, expliquant la chute proportionnellement moins importante (par rapport aux valeurs initiales) observée après ce premier pic dans l'hypothalamus antérieur et l'OVLT (0,440 ± 0,057 ng) que dans l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane.

Les neurones participant au tractus préoptico-terminal élaboreraient alors au repos très peu de LRF par rapport aux autres neurones de l'hypothalamus antérieur (≃ 7 p. 100) et, sous l'effet d'une activation augmenteraient leur sécrétion d'environ 10 fois (alors que les autres neurones ne l'augmentent que d'un facteur proche de 1,9).

2°) Si au contraire, on considère que les cellules de l'hypothalamus médiobasal connaissent une certaine activation dans la période préovulatoire :

a. et que les neurones en provenance de l'hypothalamus antérieur se projettant dans l'éminence médiane n'interviennent pas, ou d'une façon négligeable (soit car ils ne seraient pas directement impliqués dans le contrôle de la sécrétion cyclique de la LH, soit parce qu'ils sont en nombre négligeable chez le cobaye) alors l'activation des neurones de l'hypothalamus médiobasal pourrait atteindre au maximum 76 p. 100 de celle des neurones du tractus préoptico-terminal. Ceci signifierait, soit que leur activation serait moindre, soit que seulement 57 p. 100 des neurones seraient activés (c'est-à-dire 2,7 fois le nombre des neurones du tractus préoptico-terminal susceptibles d'être activés simultanément dans l'hypothalamus antérieur).

Cette hypothèse confèrerait aux neurones du tractus préoptico-terminal une participation vraiment très importante à l'augmentation totale de la sécrétion du LRF (27 p. 100), ce qui est assez improbable.

b. et qu'environ 10 à 15 p. 100 du LRF de l'hypothalamus médiobasal provient de l'hypothalamus antérieur (ce qui correspond à une quantité égale à la moitié du LRF contenu dans la fraction 2), alors l'activation des cellules

de l'hypothalamus médiobasal provoque une augmentation des taux de LRF d'un facteur égal en moyenne à 71 p. 100 du facteur d'augmentation constaté dans l'hypothalamus antérieur, soit que l'activation est moindre, soit qu'environ 53 p. 100 des neurones de l'hypothalamus médiobasal sont activés (2,25 fois le nombre de ceux de l'hypothalamus antérieur appartenant aux tractus préoptico-terminal ou hypothalamo-infundibulaire).

c. Si environ 25 p. 100 du LRF de l'hypothalamus médiobasal provient de l'hypothalamus antérieur (soit en moyenne un taux de LRF égal à celui contenu dans l'hypothalamus antérieur), l'activation des cellules de l'hypothalamus médiobasal provoquerait une augmentation des taux de LRF d'un facteur égal à environ 67 p. 100 du facteur d'augmentation dans l'hypothalamus antérieur. (46 p. 100 seulement des neurones de l'hypothalamus médiobasal seraient concernés, soit 1,7 fois le nombre de neurones de l'hypothalamus antérieur).

Evidemment ces calculs sont très hypothétiques car ils comportent beaucoup d'inconnues et ne constituent qu'une tentative de représentation schématique de ce qui pourrait être dans les grandes lignes.

Néanmoins, dans tous les cas, l'activation des neurones à LRF de l'hypothalamus antérieur provoque une augmentation proportionnellement très importante des taux de LRF et leur participation à la régulation de la sécrétion cyclique de la LH chez le cobaye est très probable (CROIX 1982 a).

Pour le moment, on ne peut qu'émettre des hypothèses à propos du rôle joué par la sécrétion des neurones du tractus préoptico-terminal dans cette régulation.

F - ACTH

Notre étude a porté sur 79 cobayes.

Sauf durant l'oestrus, où des animaux ont été sacrifiés à des heures différentes, durant le reste du cycle, ils ont été sacrifiés vers 10 h et vers 16 h 30 afin de standardiser l'expérimentation.

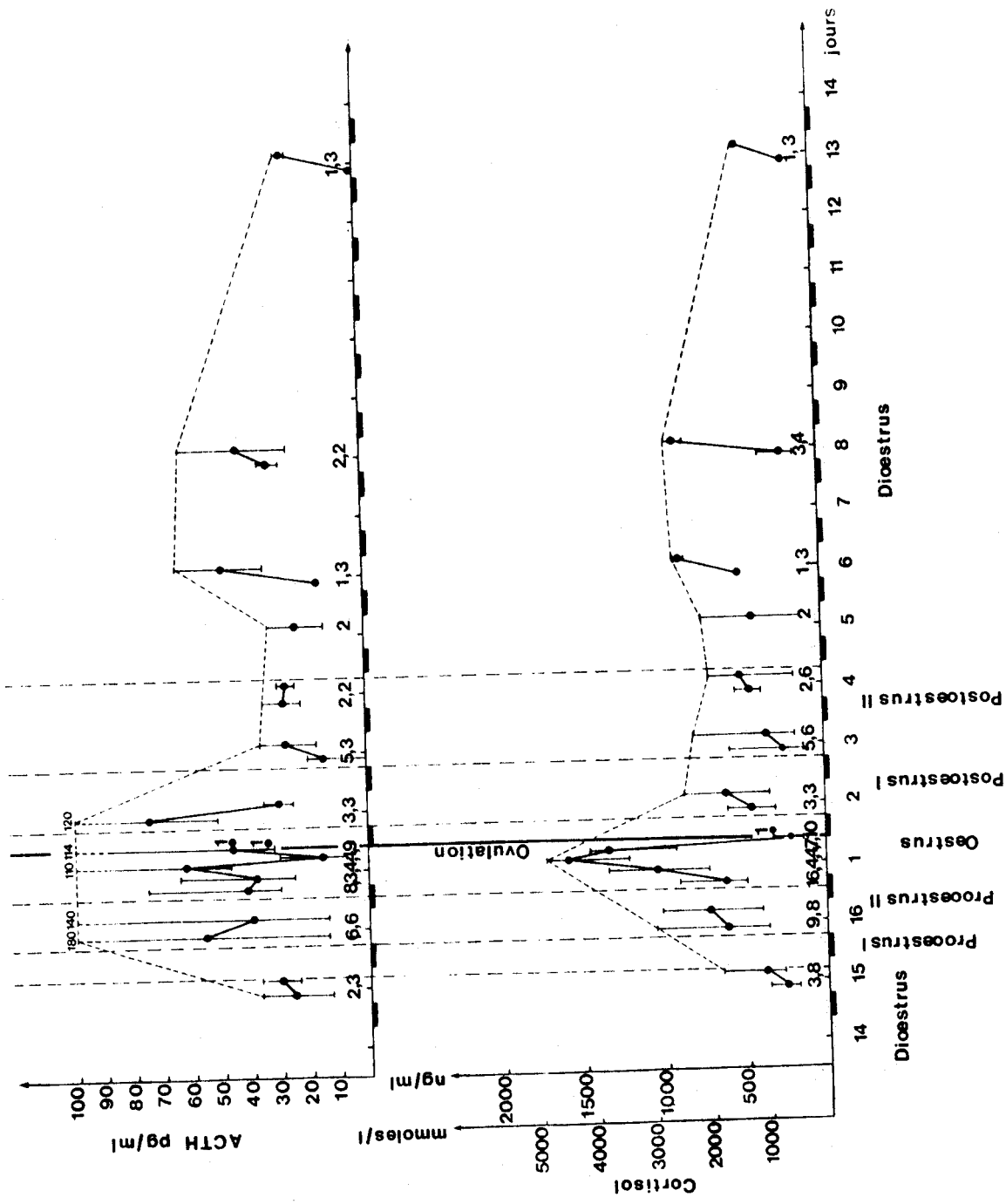
Les taux d'ACTH plasmatique, chez le cobaye, semblent suivre un rythme circadien ; ceci est surtout visible pendant le dioestrus où les valeurs, en moyenne, doublent entre 10 h le matin et 16 h 30 l'après-midi. (moyennes de l'ensemble des valeurs de dioestrus, jours 6, 8 et 13, le matin : 20 $\pm$ 7,5 pg/ml (n = 4), l'après-midi : 40 $\pm$ 6 pg/ml (n = 7) ($P < 0,1$). La concentration maximale atteinte par un animal en dioestrus (après-midi du 6ème jour) est de 64 pg/ml (fig. n° 20, p. 119) ; les concentrations moyennes sont alors de 49 $\pm$ 10 pg/ml (n = 3).

Durant le prooestrus, l'oestrus et le début du postoestrus, des valeurs très importantes sont observées pour certains animaux : jusqu'à 180 pg/ml soit environ 9 fois le taux de base. Etant donné la durée de vie très courte de l'ACTH dans le plasma, ces valeurs reflètent fort probablement l'existence de décharges pulsatiles importantes d'ACTH chez le cobaye, à cette phase du cycle.

Le rythme circadien est alors masqué par ces variations importantes : en effet, on trouve des taux très élevés le matin en prooestrus et en oestrus ; avant l'ovulation ces taux chutent d'en moyenne 62 $\pm$ 17 pg/ml (n = 4) (mais pouvant atteindre 110 pg/ml), à 15,2 $\pm$ 7,0 pg/ml (n = 4) ($P < 0,05$) valeur, de plus, faible pour l'heure du prélèvement (16 h 30). Au moment de l'ovulation, les taux réaugmentent (moyenne de 47 $\pm$ 10 pg/ml (n = 9), mais avec des valeurs pouvant atteindre 114 pg/ml) et ceci quelle que soit l'heure à laquelle s'est produite l'ovulation : le plus souvent, dans nos expériences, entre 18 h et 20 h, mais aussi, pour certains animaux, plus tôt dans l'après-midi ou, au contraire, dans la nuit ou le lendemain matin.

Chez ces cobayes qui ont ovulé en fin d'après-midi ou dans la nuit, le jour suivant, à 10 h, les taux d'ACTH sont encore nettement plus élevés que la normale (76 $\pm$ 23 pg/ml (n = 3), pouvant atteindre 120 pg/ml). Vers 16 h, ils sont redescendus à 30,2 $\pm$ 3,5 pg/ml (n = 3).

Figure n° 20 : Modifications des taux sanguins d'ACTH et de cortisol chez le cobaye, au cours du cycle oestral.
Les barres verticales représentent l'amplitude ; (le nombre d'animaux est indiqué pour chaque point) ; la période d'obscurité est marquée par une zone sombre en abscisse.


ACTH pg/ml
Cortisol
mmoles/l
ng/ml
Ovulation
Dioestrus
Proestrus I
Proestrus II
Oestrus
Postoestrus I
Postoestrus II
jours

BUS LILLE

G - CORTISOL

Les dosages ont été effectués sur 112 animaux, le plus souvent sacrifiés, comme pour les dosages de l'ACTH, à 10 h ou à 16 h 30.

Pendant le dioestrus, le rythme circadien des taux de cortisol est très net ; il est parallèle au rythme de la sécrétion de l'ACTH (taux minimums à 10 h avec une valeur de 710 ± 190 nmoles/l (n = 5) pour l'ensemble des jours 6, 8 et 13 ; ils sont en moyenne 2,9 fois plus importants vers 16 h 30 : 2075 ± 182 nmoles/l (n = 10) $P < 0,001$). La valeur la plus haute constatée chez un animal, pendant le dioestrus, dans l'après-midi du 8ème jour du cycle est de 2600 nmoles/l (fig. n° 20, p. 119).

En prooestrus et en postoestrus, ce rythme existe également mais avec des écarts moins importants : valeurs 1,5 fois plus élevées à 16h 30 qu'à 10 h, ceci probablement en raison du fait que vient se greffer une sécrétion épisodique de cortisol, liée aux variations pulsatiles périovulatoires de la sécrétion de l'ACTH ; ainsi, en prooestrus, à 10 h, les taux sont déjà relativement élevés : 1681 ± 141 nmoles/l (n = 9) en moyenne, pouvant parfois atteindre 2900 nmoles/l.

En oestrus préovulatoire, on observe un pic à 4386 ± 317 nmoles/l (n = 4) vers 16 h et à 3687 ± 399 nmoles/l (n = 7) vers 18 h, soit des valeurs significativement plus élevées ($P < 0,01$ et $P < 0,05$) que la valeur moyenne maximale de 2450 ± 62 nmoles/l (n = 4) observée en dioestrus (le 8ème jour vers 16 h 30).

Les taux s'effondrent juste au moment de l'ovulation à 637 ± 16 (n = 10) nmoles/l. Cette chute a lieu quelle que soit l'heure à laquelle se produit l'ovulation, par exemple, même chez les animaux ayant ovulé vers 16 h, heure à laquelle le cortisol circulant est généralement élevé. Chez les autres cobayes (ceux qui ont ovulé vers 18-20 h), cette chute n'est donc pas essentiellement le fait du rythme circadien de la sécrétion de cortisol, mais est bien liée, pour une grande part, à l'ovulation elle-même. Elle intervient d'ailleurs après une baisse correspondante des taux de l'ACTH plasmatique observée peu avant l'ovulation (CROIX 1982 c).

VIII - CYCLE OESTRAL DU SINGE ECUREUIL

Seuls les animaux dont les coupes histologiques des ovaires indiquent qu'il se produit un déroulement normal du cycle oestral, malgré la captivité, ont été retenus.

A - LH

En phase folliculaire, les taux de la LH sérique se situent entre 3,10 ± 0,63 mUI/ml et 4,81 ± 0,77 mUI/ml ; toutefois, en phase folliculaire moyenne on observe un pic d'assez faible amplitude (mais significatif : $P < 0,05$) à 7,38 ± 0,38 mUI/ml et de très courte durée.

Juste avant l'ovulation, la LH s'élève à 8,85 ± 2,16 mUI/ml et atteint 17,30 ± 8,87 mUI/ml à l'ovulation. Après l'ovulation, elle chute à 2,70 ± 0,75 mUI/ml. En phase progestative elle remonte à 5,95 ± 0,85 mUI/ml (fig. n° 21 p. 122).

B - FSH

En phase folliculaire, la FSH sérique a des valeurs comprises entre 5,35 ± 0,82 mUI/ml et 9,50 ± 1,21 mUI/ml. Au moment de l'ovulation, les taux s'élèvent à 19 ± 9 mUI/ml et atteignent 46,0 ± 13,6 mUI/ml peu après l'ovulation. En début de phase progestative ils retombent à 6,75 ± 1,81 mUI/ml.

Le pic de FSH se produit avec un très léger retard par rapport à celui de LH mais il n'y a pas une dissociation très nette comme celle que nous observons chez le cobaye (fig. n° 21, p. 122).

Le graphique se rapproche de celui observé chez le singe Rhésus (GOODMAN et coll. 1977) et chez la femme (FRANCHIMONT 1971 , 1972). Les taux de gonadotrophines sont cependant en moyenne 10 fois moins élevés que chez la femme (FRANCHIMONT 1971, 1972, DUFAU et coll. 1977).

C - Progestérone

En début de phase folliculaire précoce, les taux de progestérone sont de 3,86 ± 1,21 ng/ml. En fin de phase folliculaire précoce, un premier pic de faible amplitude (mais significatif : $P < 0,05$) : 12,30 ± 0,94 ng/ml, est observé.

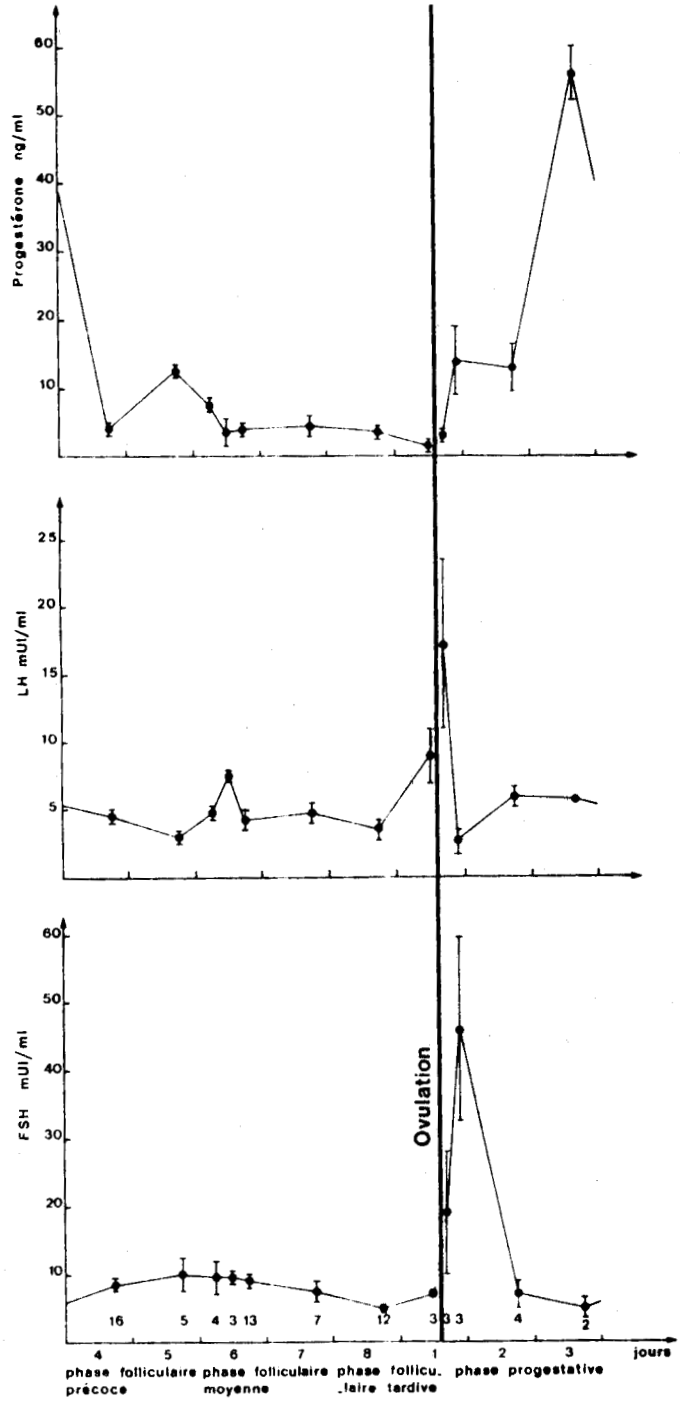


Figure n° 21 : Modifications des taux sériques de progestérone, de LH et de FSH au cours du cycle oestral, chez le singe écureuil. Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne. Le nombre d'animaux est indiqué pour chaque point.

BUS LILLE

Les taux chutent à 3,55 ± 1,96 ng/ml en début de phase folliculaire moyenne (au moment où l'on constate une élévation de la LH sérique). Ils se maintiennent à ces valeurs basses jusqu'à l'ovulation. Peu avant l'ovulation, alors que le pic de LH est déjà amorcé, ils sont à 1,60 ± 0,81 ng/ml. Au moment de l'ovulation ils commencent à s'élever pour atteindre 14,00 ± 5,39 ng/ml, valeur à laquelle ils se maintiennent jusqu'en phase progestative. En fin de phase progestative, ils atteignent 56,20 ± 4,19 ng/ml (fig. n° 21, p. 122).

De même que WILSON 1977, nous observons une chute des taux de progestérone 2 jours avant l'oestrus, en phase folliculaire moyenne, mais, à la différence de cet auteur, nous avions déjà observé une première chute de la progestérone (16 animaux) en début de phase folliculaire précoce (CROIX 1982 b). Les coupes histologiques des ovaires de ces animaux montraient des corps progestatifs indiquant qu'il y avait eu ovulation le cycle précédent. Les taux peu élevés de progestérone ne sont pas alors imputables au fait que ces singes femelles ne seraient pas "cycliques". Chez nos animaux, en phase folliculaire moyenne et jusqu'à l'ovulation, les taux se maintiennent bas et, à l'ovulation, ils n'augmentent que modérément par rapport aux taux atteints en phase progestative. (Les coupes des ovaires montrent alors, soit une croissance folliculaire normale, soit des follicules venant d'ovuler, planche VII, p. 124, soit des corps progestatifs récents).

Nos estimations sont moins élevées que celles de WILSON 1977, tant pour les valeurs maximales (52-60 ng/ml / 85-151 ng/ml) que pour les valeurs minimales (1,6 ng/ml / 25 ng/ml).

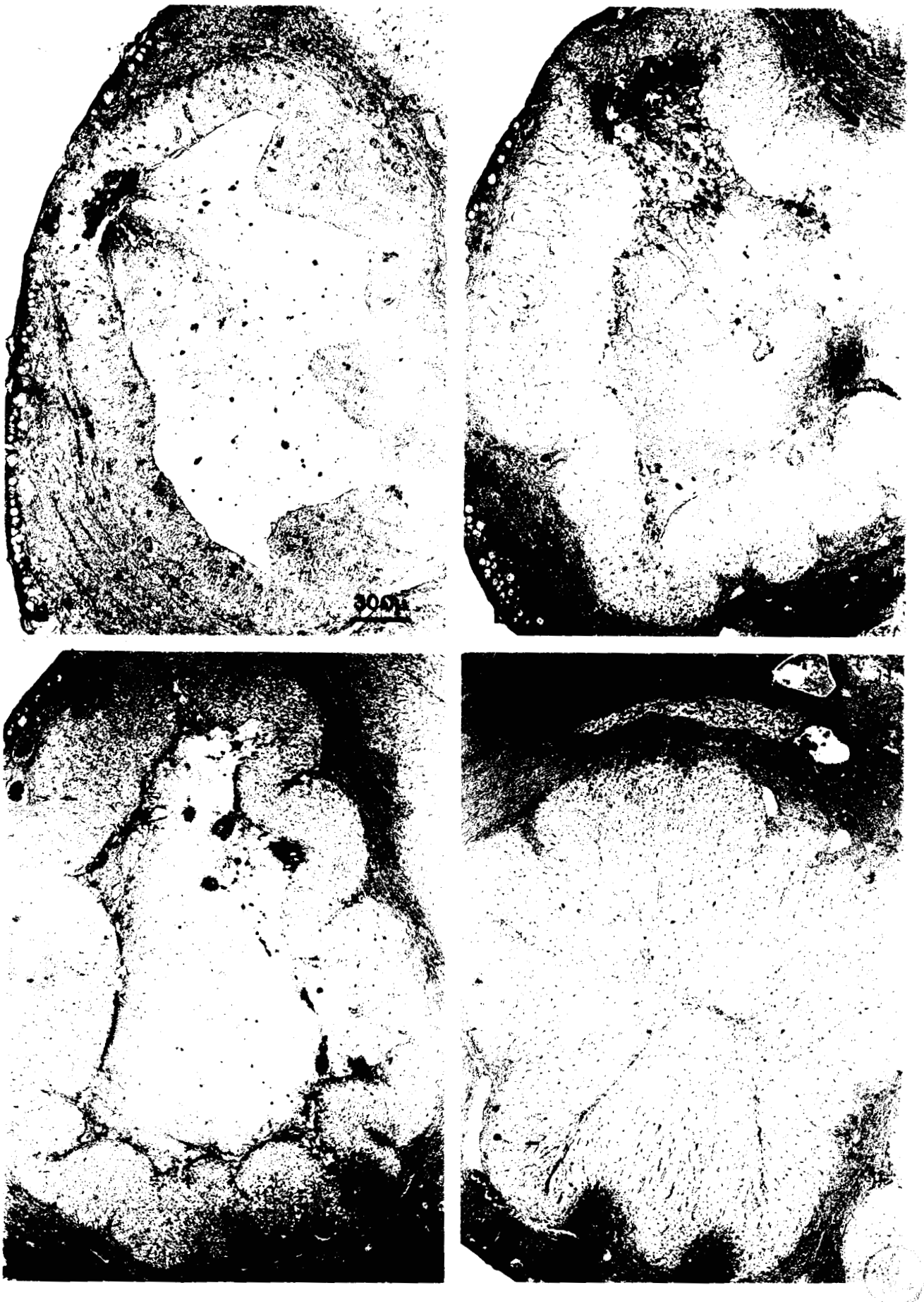
Le schéma des variations des taux de progestérone au cours du cycle oestral que nous obtenons, chez le singe écureuil, diffère du schéma décrit pour le cobaye (où il y a une dissociation nette des pics préovulatoires de LH, progestérone et FSH) mais il est assez semblable à ceux décrits pour les autres primates. Cependant, les concentrations atteintes à l'ovulation et surtout en phase progestative, restent très importantes (elles sont en moyenne 10 fois plus élevées que celles données par HODGEN et coll. 1976, KARSCH et SUTTON 1976 chez le singe Rhésus et 4 fois plus élevées que celles données par FRANCHIMONT et coll. (1973) chez la femme). Bien que la phase lutéale soit probablement de courte durée (2 jours environ d'après les auteurs), les coupes des ovaires montrent des corps progestatifs très volumineux.

Planche VII : Corps progestatifs cycliques chez le singe écureuil.

a - peu après l'ovulation (zone de déhiscence encore nettement visible).

b,c - en formation (cavitaires).

d - constitué (centre fibreux).



D - LRF

Les taux de LRF tissulaire total, chez le singe écureuil femelle, se situent entre 3,38 ± 0,42 ng et 5,285 ± 0,320 ng (Tableau VIII, p. 126).

En phase folliculaire précoce, ils sont bas, tant dans l'hypothalamus antérieur et la lame terminale (99 ± 30 pg à 220 ± 140 pg/animal) que dans l'hypothalamus médiobasal et l'éminence médiane (2,97 ± 0,15 ng à 3,31 ± 0,35 ng/animal). Fig. n° 22, p. 127).

En début de phase folliculaire moyenne, un pic (significatif, $P < 0,01$, bien que n'ayant pu être observé que chez 3 animaux) de LRF à 4,845 ± 0,155 ng (soit 1,63 fois le taux de base) est tout d'abord constaté dans l'hypothalamus médiobasal ; il est de très courte durée et très vite les taux retombent à des valeurs proches de 3 ng.

Les taux de LRF qui étaient restés bas dans l'hypothalamus antérieur augmentent alors de façon proportionnellement très importante (taux de base multipliés par 11,4) et atteignent 1,125 ± 0,0750 ng ($P < 0,001$). A la différence de ce qui se produit dans l'hypothalamus médiobasal, ces valeurs se maintiennent jusqu'à l'ovulation.

A l'ovulation, une baisse est observée tant dans l'hypothalamus médiobasal (2,52 ± 0,06 ng) que dans l'hypothalamus antérieur (500 ± 5 pg) ($P < 0,02$).

Les variations du LRF total reflètent la somme des variations que nous avons décrites pour ces deux régions (Fig. n° 22, p. 127) (CROIX 1982 b).

TABLEAU VIII : LRF tissulaire au cours du cycle oestral, chez le singe écureuil

pg/animal ± S.E.M.	OVLT et zone préoptique 1	hypothalamus médiobasal 2	posthypophyse 3	2 + 3	mésencéphale 4	ganglions habénulaires 6	T	n
phase folliculaire précoce	220 ± 140	1720 ± 680	1250 ± 550	2970 ± 150	Σ	190 ± 59	3380 ± 420	3
	99 ± 30	920 ± 280	2390 ± 60	3310 ± 350	Σ	99 ± 20	3508 ± 297	3
		11,4	P < 0,01		1,63			
phase folliculaire moyenne	245 ± 96	3475 ± 275	1370 ± 430	4845 ± 155	Σ	90 ± 30	5180 ± 30	3
P < 0,001	680 ± 100	2200 ± 180	660 ± 80	2860 ± 100	10 ± 5	220 ± 70	3770 ± 280	2
	1125 ± 75	2110 ± 190	1065 ± 85	3175 ± 275	480 ± 120	500 ± 60	5280 ± 170	3
	900 ± 60	2250 ± 210	640 ± 50	2890 ± 260	700 ± 150	370 ± 60	4860 ± 240	2
phase folliculaire tardive	980 ± 70	2750 ± 210	870 ± 70	3620 ± 120	Σ	620 ± 70	5220 ± 370	3
P < 0,02			P < 0,3		P < 0,02			
ovulation	500 ± 50	1822 ± 190	700 ± 130	2520 ± 60	100 ± 20	460 ± 60	3580 ± 20	2
phase progestative	1100 ± 110	1750 ± 130	1250 ± 20	3000 ± 150	180 ± 20	210 ± 120	4490 ± 190	2
	760 ± 90	2200 ± 230	1230 ± 30	3430 ± 200	145 ± 20	950 ± 190	5285 ± 320	2
♂	95	2735	3050	5785	573	Σ	6453	1

BIUS LILLE

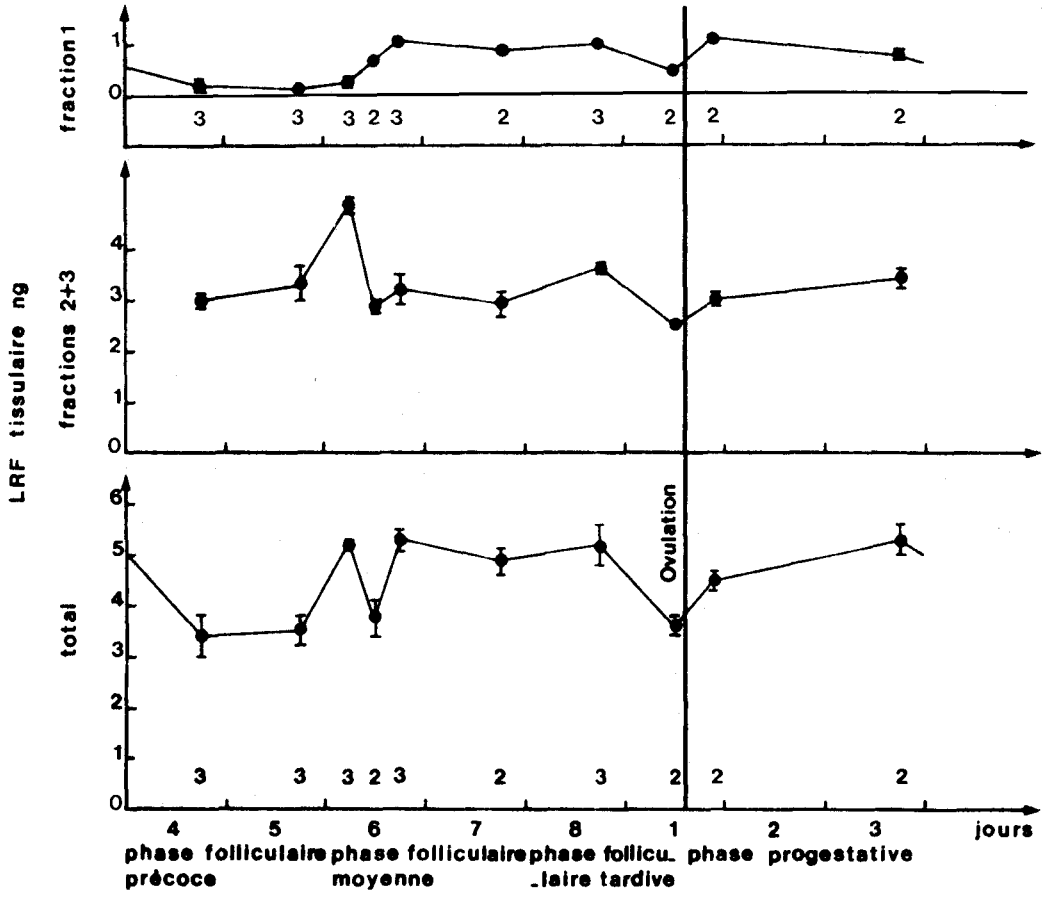


Figure n° 22 : Modifications des taux du LRF tissulaire au cours du cycle oestral, chez le singe écureuil.

fraction 1 : hypothalamus antérieur et lame terminale
fraction 2 + 3 : hypothalamus médiobasal, éminence médiane et posthypophyse.

Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne.
Le nombre d'animaux est indiqué pour chaque point.

E - CORTISOL

Le cortisol est le principal corticostéroïde sécrété par la glande surrénale du singe écureuil (KITTINGER et BEAMER 1968).

Les dosages ont été effectués sur 61 singes femelles gardés en cage (4 par cage) et sacrifiés à 17 h.

Les taux observés sont très élevés. Au cours du cycle oestral (Fig. n° 23, p. 129) ils oscillent entre 9212 ± 963 nmoles/l à l'ovulation (soit environ 335 µg/100 ml) et 11481 ± 731 nmoles/l en fin de phase folliculaire précoce (environ 417 µg/100 ml).

Il semble se produire une légère chute des valeurs au moment de l'ovulation : elles passent de 10518 ± 1310 nmoles/l en fin de phase folliculaire (2 animaux) à 9212 ± 963 nmoles/l juste après l'ovulation (2 animaux) ; mais cette baisse faible et observée que chez peu d'animaux n'est pas significative : $P < 0,5$.

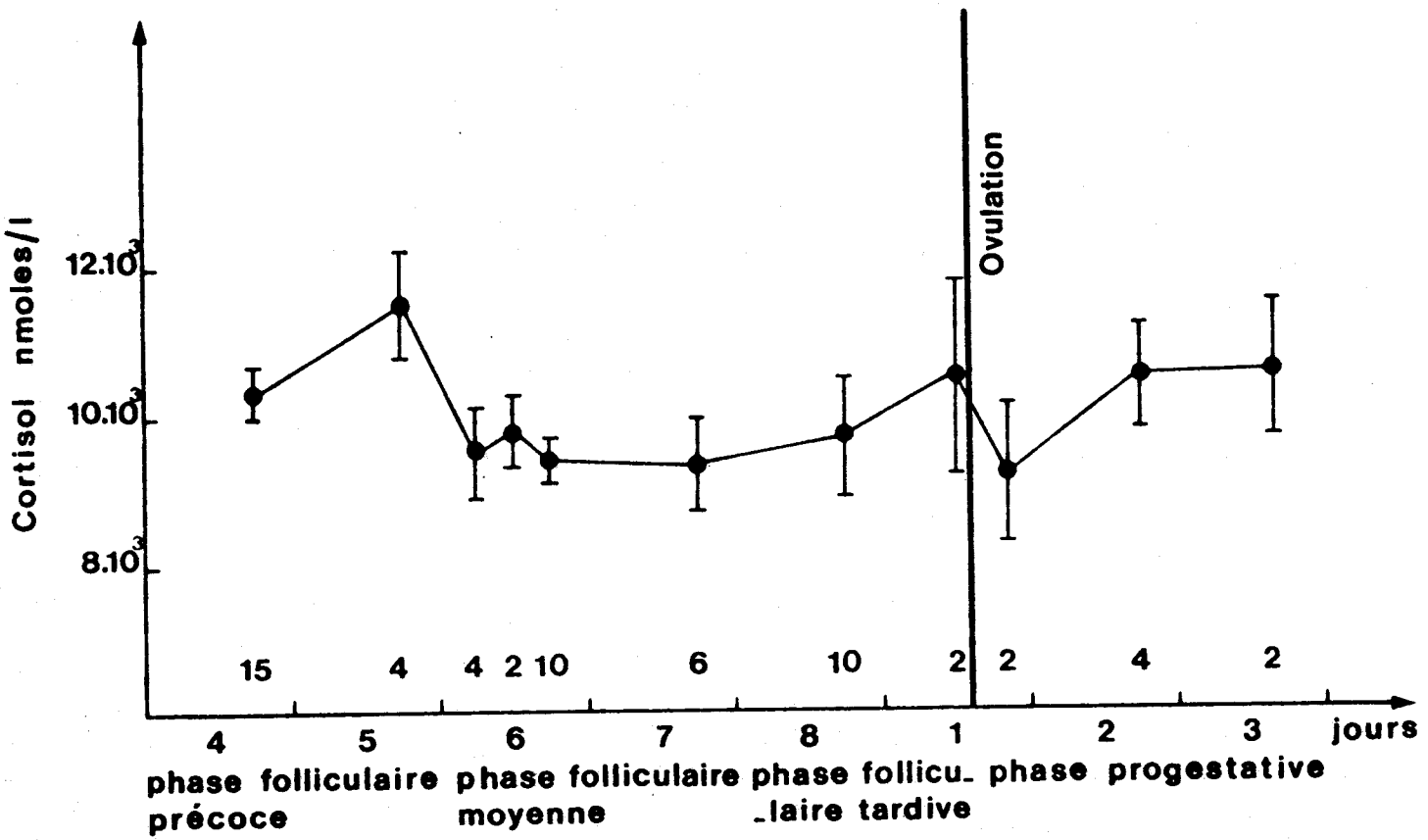


Figure n° 23 : Modifications des taux du cortisol sanguin au cours du cycle oestral, chez le singe écureuil (± S.E.M.)

D I S C U S S I O N

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 parfois 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 le FSH ou la LH de cobaye ; aussi, même en se plaçant dans les meilleures conditions possibles, c'est-à-dire en prenant les adénohypophyses de cobayes de 10-30 jours, la quantité de matériel de départ reste faible ; en effet, les antéhypophyses 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 µg 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 mg - 276 µg NIH FSH SI) (BROWN 1971).

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, par électrofocalisation des gonadotrophines humaines avait toujours trouvé une activité LH associée à la fraction FSH, récemment KERCRET et DUVAL (1975) sont parvenus à isoler, à partir d'adénohypophyses 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), lapin (DUFY-BARBE et coll. 1972), boeuf (DERIVAUX et coll. 1974), cobaye (CROIX et FRANCHIMONT 1975), mais aussi celles d'oiseaux : canard (CROIX et coll. 1974).

Les gonadotrophines sont composées de deux sous-unités α et β . Les sous-unités α auraient une structure très voisine pour la FSH, la LH et la TSH, mais seraient spécifiques de l'espèce ; les sous-unités β 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 a-b).

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).

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

Néanmoins, bien que la FSH humaine native inhibe la réaction entre la FSH marquée de rat et les anticorps anti FSH ovine et que la structure de la FSH de singe écureuil semble se rapprocher de celle de la FSH humaine, l'affinité de la FSH de singe pour cet antisérum anti FSH ovine est trop faible pour que nous puissions utiliser ce système pour cette espèce.

On peut noter que la βFSH est incapable de produire seule une inhibition, l'association des deux sous-unités α et β de l'hormone serait donc nécessaire pour que l'anticorps puisse être fixé.

Ceci est en accord avec les résultats trouvés lors des dosages

biologiques effectués sur les sous-unités séparées (DE LA LLOSA 1972) 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 structures de la FSH et de la LH sériques du singe écureuil semblent être suffisamment proches de celles de la FSH et de la LH humaines pour provoquer une compétition complète dans des systèmes homologues humains, ceci, évidemment, à la condition que l'antisérum choisi possède un nombre suffisamment élevé d'anticorps dirigés contre des sites antigéniques non spécifiques de l'espèce, ce qui est le cas pour l'anti HFSH de Calbiochem et l'anti HLH du C.E.A. mais non pour les anti HLH de Calbiochem et de l'Institut Pasteur.

A la différence du cobaye où il y a analogie immunologique entre hormone préhypophysaire et hormone sérique, chez le singe écureuil, l'hormone préhypophysaire contenue dans les extraits non purifiés, aussi bien FSH que LH, est nettement moins immunoréactive que l'hormone sérique.

HUMMEL et coll. (1974), avec des antisérums provenant du NIAMDD, NIH (Bethesda, Maryland), n'ont obtenu qu'une très faible réaction croisée de la FSH et de la LH hypophysaires de singe écureuil dans les systèmes correspondants humains, alors que la GH (growth hormone) et la TSH (Thyroid-stimulating hormone) hypophysaires présentent, elles, une compétition complète ou du moins très importante avec la HGH et la HTSH.

Cette différence d'immunoréactivité entre FSH et LH sériques et hypophysaires peut être due à la possibilité que certains sites de l'hormone hypophysaire soient masqués par la présence de matériel contaminant plus ou moins adsorbé, mais aussi et sans doute principalement, à une différence de conformation spatiale. Pour vérifier ce fait, il faudrait pouvoir obtenir des fractions enrichies en hormone, ce qui est, pour le moment, peu envisageable chez le singe.

Des formes distinctes de FSH (CHAPPEL 1981, chez le hamster) et de LH (CAMPBELL et coll. 1978, chez le rat) ont en effet été décrites, suivant que ces hormones provenaient de l'hypophyse (forme de stockage) ou du sérum (forme excrétée).

Au cours du cycle du cobaye, nous observons un pic de LRF hypothalamique en début de prooestrus II, c'est-à-dire le jour qui précède celui de la décharge préovulatoire de LH;chez le singe écureuil, chez trois animaux nous constatons un pic de LRF dans l'hypothalamus médiobasal en phase folliculaire moyenne, suivi d'une augmentation du LRF dans l'hypothalamus antérieur qui se maintiendra jusqu'à l'ovulation (10 animaux). Ce pic de LRF pourrait correspondre à celui observé dans le plasma chez la femme par MIYAKE et coll. (1980) et dont ils faisaient remarquer qu'il n'avait pas lieu le jour du pic de LH mais dans le ou les jours qui précèdent, ou encore aux taux de LRF élevés trouvés par les auteurs précités chez le rat dans l'hypothalamus médiobasal ou dans le sang tôt le matin du prooestrus. Ce LRF pourrait alors effectuer une première sensibilisation de la préhypophyse à une action ultérieure du décapeptide. En effet, il a été démontré que la sensibilité de la glande pituitaire au LRF était accrue avant et pendant le pic préovulatoire de LH (AIYER et coll. 1974), mécanisme qui pourrait être initié par l'augmentation des taux sanguins de 17 β-oestradiol (ARIMURA et SCHALLY 1971, COOPER et coll. 1974, SARKAR et FINK, 1979) mais qui résulterait de l'action du LRF lui-même (GORDON et REICHLIN 1974, ARAKI et coll. 1975, FINK et coll. 1976, PICKERING et FINK 1979).

Chez le rat, les auteurs ont tous constaté une chute du LRF hypothalamique et sanguin avant la décharge de LH. Certains ont décrit un nouveau pic du LRF dans l'hypothalamus médiobasal et le sang au moment de la décharge de LH (KALRA et KALRA 1977, BARR et BARRACLOUGH 1978).

Chez le cobaye, nous observons des variations comparables à ces derniers résultats. En effet, après une baisse du LRF en fin de prooestrus II et en début d'oestrus, il se produit un second pic, précédant de peu l'augmentation des taux de LH antéhypophysaire et la cession de cette LH dans le sang. Ceci est en accord avec les résultats de WEBB et coll. (1981) qui montrent que la sécrétion de LH par la glande pituitaire requiert la présence continuelle de LRF pendant toute la phase ascendante du pic préovulatoire.

Ce pic n'est pas observé chez la femme par MIYAKE et coll. (1980) mais ces auteurs n'excluent pas l'éventualité de ne pas avoir effectué un prélèvement exactement au bon moment.

On sait que la réponse de l'antéhypophyse pour la rapidité, l'intensité et la durée de la sécrétion de LH est fonction de l'intensité et de la durée de la décharge de LRF. Cependant, après une exposition prolongée au LRF, les taux de LH plasmatiques diminuent, ce qui pourrait laisser supposer que la

glande pituitaire devient réfractaire à la stimulation par le LRF (PIPER et coll. 1975, BLAKE 1976, de KONING et coll. 1978). En fait, SHERWOOD et coll. (1980) ont montré qu'au contraire l'hypophyse répondait alors à une nouvelle injection de LRF de façon beaucoup plus rapide et plus intense que lors de la première stimulation (qui avait eu lieu 6 h avant) ; travaux concordants avec ceux de AIYER et coll. (1973), CASTRO-VASQUEZ et Mc CANN (1975).

Les mécanismes pourraient être rapprochés de nos observations concernant l'élévation à deux reprises des taux de LRF dans la période préovulatoire.

Le second pic de LRF accuse une légère diminution au moment du maximum de la décharge de LH, mais il se maintient encore relativement élevé jusqu'à l'ovulation.

Il s'effondre à des taux très bas, jamais atteints au cours du cycle, à l'ovulation, peu après le pic préovulatoire de progestérone.

La décharge du LRF dans le sang portal s'effectuerait de façon pulsatile (CARMEL et coll. 1976, BARR et BARRACLOUGH 1978).

Les quantités de LRF nécessaires pour induire un pic de la LH sont très faibles par rapport aux quantités stockées dans l'hypothalamus (≃ 2 p. 100) (SHERWOOD et coll. 1980). Au cours du pic spontané préovulatoire de LH chez le rat, les concentrations maximales en LRF dans le sang portal sont de 150 pg/ml avec une vitesse de sécrétion approximative de 65 pg/h (SARKAR et coll. 1976) et chez le lapin, la cession de 30 à 45 pg de LRF/ml dans le sang portal provoque cette décharge de LH (TSOU et coll. 1977).

Il est possible que, comme pour les hormones neurohypophysaires (SACHS et coll. 1969, THORN 1970), seule une petite partie du LRF stockée soit excrétable. De plus, la sortie du LRF pourrait être stoppée par l'inactivation de la perméabilité membranaire aux ions Ca^{2+} (BAKER et RINK 1975, NORDMANN 1976), résultant d'une diminution de l'activité électrique des neurones à LRF (qui pourrait être la conséquence de l'action de neurotransmetteurs classiques : sérotonine... ou de neuropeptides : enképhalines ...). En outre, des facteurs extrinsèques, telle la progestérone (SARKAR et FINK 1979) seraient également capables "d'éteindre" la décharge de LRF ou de limiter son amplitude.

La progestérone exercerait une action biphasique sur la décharge préovulatoire de la LH, d'abord facilitante, puis inhibitrice. Chez le singe, l'injection de progestérone avance le pic préovulatoire de LH mais en diminue

l'amplitude de 50 p. 100 par rapport à l'effet obtenu par l'injection d'oestradiol uniquement (HELMOND et coll. 1981). Après avoir accéléré la sécrétion de gonadotrophine, la progestérone en réduirait la durée.

Les sites de l'action inhibitrice se localiseraient dans le système nerveux central (hypothalamus médiobasal et peut-être aire préoptique) (BLAKE 1977, De PAOLO et BARRACLOUGH 1979, GOODMAN et KNOBIL 1981) ; cette action pourrait consister en un blocage de la rétroaction positive de l'oestradiol (AXELSON et coll. 1981) mais il faut noter que ATTARDI 1981 n'a pas trouvé de diminution significative du nombre des récepteurs aux oestrogènes dans l'aire hypothalamique préoptique après injection de progestérone ; il est donc peu probable que cette action s'exerce sous la forme d'une compétition pour la fixation sur les récepteurs.

Etant donné que l'injection de progestérone seule ne stimule pas la cession de LRF (SARKAR et FINK 1979) l'effet facilitant s'exercerait essentiellement directement sur la préhypophyse par une potentialisation du mécanisme de sensibilisation de l'hypophyse au LRF par les oestrogènes (SHAW et coll. 1975, LASLEY et coll. 1975, LAGACE et coll. 1980).

L'importance d'une rétroaction positive de l'oestradiol dans le phénomène de l'ovulation est, à l'heure actuelle, incontestée. Cette action s'exerce d'une part sur l'hypophyse, par une augmentation de sa sensibilité au LRF (SCHALLY et coll. 1973, DROUIN et coll. 1976), d'autre part au niveau du cerveau.

Chez le cobaye, nous observons une augmentation des taux d'oestradiol circulant en fin de dioestrus et en début de prooestrus I, précédant et accompagnant les décharges préovulatoires de LRF.

La progestérone et l'oestradiol pourraient avoir une action synergique sur la sensibilisation de l'antéhypophyse au LRF, mais, dans la majorité des cas, l'élévation importante de la progestérone ne précède pas la décharge ovulatoire de LH mais est simultanée ou lui succède (YUSSMAN et coll. 1970, BARRACLOUGH et coll. 1971, PIACSEK et coll. 1971).

Chez le cobaye, nous avons trouvé (CROIX et FRANCHIMONT 1975) que le pic de progestérone atteignait son maximum le plus souvent avec un retard par rapport au pic de LH. Ceci a été confirmé par BLATCHLEY et coll. (1976). Il faut cependant noter que ce pic est le plus souvent aussi déjà amorcé lorsque débute la décharge de LH.

Chez le singe écureuil, nous constatons que la progestérone s'élève également après que le pic ovulatoire de LH ne soit déclenché.

Cependant, et de façon surtout nette chez le singe, une augmentation très modérée de la progestérone, suivie d'un retour immédiat à la normale, est observée juste avant que les taux hypothalamiques de LRF ne commencent à s'élever en phase folliculaire moyenne chez le singe écureuil et en début de proœstrus II chez le cobaye. Cette variation de la progestérone, bien que modérée (et vérifiée que chez peu d'animaux pour le cobaye), joue peut-être un rôle sur l'induction de la première élévation du LRF qui aurait pour effet une primo-sensibilisation et qui n'est d'ailleurs accompagnée que d'une élévation faible de la LH sérique.

Ainsi que KALRA et KALRA (1977) chez le rat, nous observons des taux élevés de LRF dans les autres phases du cycle oestral (notamment en post-oestrus et en fin de dioestrus) associés à des concentrations faibles de la LH sérique. Ceci se conçoit très bien étant donné que les taux d'oestradiol sont alors trop faibles pour pouvoir sensibiliser l'hypophyse à l'action du LRF.

Certains récepteurs hypothalamiques aux oestrogènes semblent davantage impliqués dans la régulation de la sécrétion de FSH que de celle de LH; de plus, la stimulation électrochimique de l'aire hypothalamique dorsale antérieure provoque une sécrétion sélective de la FSH (BARRACLOUGH et coll. 1979).

Chez le cobaye, nous avons mis en évidence une dissociation très nette des taux sériques de LH et de FSH dans divers états biologiques : cycle oestral (CROIX et FRANCHIMONT 1975, confirmée par BLATCHLEY et coll. 1976), période postnatale (CROIX 1976 a), castration, où, chez le mâle, 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 (CROIX 1977 a) ; 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) ; en outre, on sait que le LRF a une action FSH-RF relativement faible, en effet nous avons obtenu, par l'injection de LRF chez le cobaye mâle, une augmentation des taux de la LH quatre fois plus importante que celle de la FSH.

Pour expliquer ces données, deux hypothèses sont possibles :

- soit qu'il existe un FSH-RF différent du LRF
- soit que la réponse de l'hypophyse au LRF (par la sécrétion soit de LH, soit de FSH) dépende du mode par lequel le LRF se présente à l'hypophyse.

BARRACLOUGH et coll.(1979)ont montré que des stimulations électriques fréquentes et de faible intensité, afin de maintenir une décharge de LRF prolongée mais peu importante, dans l'aire préoptique médiane, provoquent une augmentation sélective de la sécrétion de FSH alors que la stimulation de cette région provoque généralement une décharge importante de LRF et de LH (TURGEON et BARRACLOUGH 1973).

Ces résultats permettent de retenir la deuxième hypothèse avec l'existence d'un RF commun à la LH et à la FSH.

La sécrétion de la LH par l'antéhypophyse nécessiterait une forte et brusque décharge de LRF alors que la sécrétion de la FSH serait induite par des concentrations en LRF relativement faibles mais prolongées.

Les taux très importants de FSH postovulatoires seraient la conséquence de l'altération de la sécrétion des stéroïdes ovariens, et donc de l'inhibition qu'ils exerçaient sur la sécrétion tonique, mais aussi (et cela semble être obligatoire chez la brebis : GOODMAN et coll. 1981) de la suppression de la sécrétion par l'ovaire d'une substance ressemblant beaucoup par ses propriétés à un facteur protéinique d'origine testiculaire :l'inhibine contenue dans le liquide séminal (SETCHELL et SIRINATHSINGHJI 1972, FRANCHIMONT 1972, FRANCHIMONT et coll. 1975 a-b, 1979). Cette substance a été isolée du liquide folliculaire (LORENZEN et coll. 1978), elle a une action inhibitrice préférentiellement sur la FSH mais aussi, dans certaines circonstances, sur la LH. Elle agirait principalement sur l'hypophyse mais pourrait peut-être aussi agir au niveau du système nerveux central : en effet, chez le mâle, il a été mis en évidence des sites d'action hypothalamiques de l'inhibine (LUMPKIN et coll. 1981).

Une telle augmentation de FSH est peut-être nécessaire à l'initiation de la future phase folliculaire.

Lors de la maturation des follicules, les récepteurs membranaires de leur thèque interne et des cellules de la granulosa deviendront aptes à répondre à la concentration basale de LH en provoquant l'augmentation des taux d'oestrogènes circulants en fin de dioestrus.

On a découvert, en outre, dans le liquide folliculaire ovarien, une nouvelle substance peptidique (PM < 3500), probablement élaborée par les cellules de la granulosa, différente du LRF (non reconnue par des antisérums anti LRF

mais dont l'action est inhibée par un antagoniste du LRF) capable d'activer la sécrétion de LH et de FSH in vivo, ou in vitro sur des cultures de cellules, et dont l'action peut s'additionner à celle du LRF. A maturité, les follicules contiennent davantage de cette substance, la gonadocrinine, que les autres follicules moins développés (YING et coll. 1981).

La LH exercerait elle-même un rétrocontrôle négatif ; rétrocontrôle dont le site d'action n'est pas l'hypophyse : TURGEON et BARRACLOUGH (1976, 1977), BARRACLOUGH et coll. (1979), ont suggéré le fait que la LH pourrait agir, par l'intermédiaire de neurones à catécholamines sur la sécrétion des neurones à LRF et également qu'elle pourrait activer des endopeptidases hypothalamiques ; en effet la LH (à la différence de la FSH ou de l'ACTH) peut augmenter l'activité de la L-cystine arylamidase hypothalamique (peptidase capable de dégrader le LRF, KUHL et TAUBERT 1975 a-b), mais ceci à condition que l'hypothalamus ait été au préalable exposé aux oestrogènes et à la progestérone.

Cette hypothèse serait évidemment séduisante pour expliquer la chute dramatique de LRF que nous observons surtout chez le cobaye au moment de l'ovulation.

Le LRF stimulerait la sécrétion de la LH et de la FSH par l'intermédiaire d'une activation de l'adénylate cyclase et l'accumulation d'AMP cyclique dans l'antéhypophyse (BORGEAT et coll. 1972, 1974).

A la différence de NAFTOLIN et coll. (1972) et de CHIAPPA et FINK (1977), qui n'ont pas observé, chez le rat, de modifications des taux de la LH hypophysaire lors de la décharge spontanée préovulatoire, mais en accord avec SCHWARTZ (1964) et plus récemment SOLANO et coll. (1980) qui, également chez le rat, observent une augmentation des taux de LH pituitaire 6 h avant la décharge sérique, nous avons observé, chez le cobaye, un contenu en LH de l'hypophyse multiplié par 4, juste après le pic préovulatoire de LRF et précédant de peu la décharge de LH dans le sérum (élévation d'un facteur 8). Cette LH préovulatoire cédée par l'hypophyse, aurait une activité biologique particulièrement élevée (DUFAU et coll. 1977 chez les primates, SOLANO et coll. 1980 chez le rat), ceci serait le résultat de l'action des taux élevés d'oestrogènes sur la glande pituitaire (GARCIA-VELA et SOLANO 1980). Il faut noter que le nombre de récepteurs ovariens à la LH (et à la FSH) qui était maximal, chez le rat, 2 h avant le pic de LH, chute 2 à 4 h après ce pic (SOLANO et coll. 1980).

Chez le cobaye, nous ne constatons pas d'augmentation des taux de la FSH hypophysaire précédant la décharge dans le sang, mais au contraire, une diminution qui est amorcée nettement avant cette décharge. Etant donné l'importance du pic de FSH sérique (il peut atteindre 300 ng/ml soit 3 fois plus que la LH) et la quantité relativement faible de FSH hypophysaire (dosable par radio-immunologie) disponible en prooestrus ($\simeq$ 10 µg/hypophyse soit 3 fois moins que la LH) il est étonnant qu'il n'y ait pas, comme pour la LH, un stockage avant la brusque cession dans le sang. De plus, la décharge de FSH dans le sang est d'une durée très longue et il faut remarquer que l'hypophyse compense très vite cette fuite continuelle de la FSH.

CHAPPEL 1981, a décrit dans l'hypophyse du hamster, deux espèces de FSH, l'une étant capable de se fixer à la concanavaline A (FSH liable) l'autre non (FSH non liable). Pendant le prooestrus, le pourcentage de la "FSH non liable" augmente pendant que celui de la "FSH liable" décroît, de telle sorte que le rapport NL/L passe de 0,11 en début de prooestrus à 0,75 juste avant la décharge de FSH dans le sang. Ce rapport chute pendant la décharge de FSH ; la FSH trouvée dans le sérum est alors la forme "non liable", qui semble représenter la forme sous laquelle la FSH est cédée par l'hypophyse.

Ces deux types de FSH, séparées par chromatographie sur Sépharose, présentent les mêmes caractéristiques pour se fixer sur les récepteurs des cellules de la granulosa ou en dosages radio-immunologiques.

De même que CHAPPEL (1981) chez le hamster, nous observons, chez le cobaye, une diminution de la FSH hypophysaire totale avant que n'apparaisse une augmentation des concentrations sériques.

Ceci peut correspondre à deux hypothèses :

- soit que la cession de la FSH dans le sang est déjà amorcée mais que les cellules hypophysaires ne sont pas encore suffisamment stimulées pour assurer un renouvellement rapide et qu'en fait la quantité de FSH cédée reste relativement faible ; diluée dans la circulation générale, elle ne fait pas apparaître alors de différences de concentrations significatives.
- soit qu'il y ait d'abord une phase de transformation "FSH liable" --► "FSH non liable" et que notre antisérum ne serait pas capable de reconnaître la totalité de cette FSH transformée dans l'hypophyse.

Mais cela supposerait que la "FSH non liable" dans l'hypophyse aurait, à un moment donné, une configuration quelque peu différente de celle qu'elle a dans le sang.

Bien que légèrement inférieurs, les taux du LRF hypothalamique total, dosable par radio-immunologie, du cobaye sont assez proches de ceux trouvés chez le rat par KALRA et KALRA (1977), BARR et BARRACLOUGH (1978), OSHIMA et coll. (1978). De même, durant le dioestrus le LRF des zones rostrales représente en moyenne 20 p. 100 du LRF hypothalamique total.

Mais chez le cobaye, d'une part les expériences de déconnexions et de destructions (SILVERMAN 1976, KREY et SILVERMAN 1978) seraient en faveur d'une plus faible participation des neurones rostraux au tractus hypothalamo-infundibulaire que chez le rat (SETALO et coll. 1976), d'autre part, alors que chez le rat la déafférentation totale de l'hypothalamus médiobasal provoque un blocage de l'ovulation (HALASZ et GORSKI 1967), chez le cobaye, elle n'empêche pas la décharge ovulatoire de gonadotrophines de se produire (TERASAWA et WIEGAND 1978), laissant supposer que l'hypothalamus médiobasal isolé contient des neurones à LRF capables de maintenir cette décharge cyclique. Des déafférentations excluant le noyau ventromédian de l'hypothalamus médiobasal et endommageant le noyau arqué bloquent l'ovulation, ce qui prouve le rôle obligatoire de l'hypothalamus médiobasal. Mais des déafférentations rostrales au noyau suprachiasmatique (endommageant l'aire hypothalamique préoptique médiane) et laissant intact l'hypothalamus médiobasal, bloquent également l'ovulation alors que des déafférentations caudales au noyau suprachiasmatique (ne touchant pas l'aire hypothalamique préoptique médiane) permettent l'ovulation. Ceci peut s'expliquer soit par le fait que les neurones de l'hypothalamus médiobasal seraient modulés par des afférences provenant de l'aire hypothalamique préoptique médiane et de zones extrahypothalamiques (exerçant des influences se "contre-balançant" plus ou moins, pour atteindre un équilibre que les expériences de déafférentations partielles - ou de destructions- détruisent), soit que cette région contienne des neurones à LRF, dont le rôle est primordial dans la décharge cyclique de LH, indépendants de l'hypothalamus médiobasal.

La première hypothèse attribue, à priori, la responsabilité de la décharge cyclique de LH aux neurones à LRF de l'hypothalamus médiobasal, tandis que la deuxième hypothèse justifie le rôle des neurones du tractus préoptico-terminal mais exclut l'intervention des neurones rostraux qui se projettent dans l'éminence médiane.

Or, suite aux travaux de BARRY et DUBOIS (1974 b) qui ont observé, en immunofluorescence, des variations de charge des neurones à LRF au cours du cycle oestral, nous avons décrit (JENNES et CROIX 1980) des changements du LRF

(visible également par des techniques d'immunofluorescence) dans la lame terminale aussi bien que dans l'éminence médiane après la parturition : on note en effet une diminution de réactivité dans la lame terminale 3 h après la parturition, juste au moment où, dans le sérum, se produit une décharge de LH présentant toutes les caractéristiques d'une décharge préovulatoire (amplitude, durée, non accompagnée d'une augmentation de FSH), et un maximum d'extinction de l'immunoréactivité dans l'éminence médiane un peu plus tardif (après 12 h).

En outre, par les dosages radio-immunologiques du LRF dans les fractions hypothalamiques, nous montrons que le contenu en LRF de l'hypothalamus antérieur subit des modifications considérables dans la période périovulatoire, proportionnellement plus marquées que celles de l'hypothalamus médiobasal et serait donc, comme chez le rat, susceptible de jouer un rôle important dans la régulation de la sécrétion cyclique de la LH.

De plus, les variations respectives des taux de LRF en prooestrus et en oestrus dans l'hypothalamus antérieur et l'hypothalamus médiobasal s'effectuent dans des proportions assez identiques à celles observées chez le rat par OSHIMA et coll. 1978, ce qui laisserait supposer une participation de l'hypothalamus antérieur à la sécrétion cyclique de LH du même ordre de grandeur dans ces deux espèces.

En fait, il est possible que le LRF élaboré par les neurones de l'hypothalamus antérieur joue essentiellement un rôle de neurotransmetteur (en effet, le LRF est efficace en tant que neurotransmetteur ou que modulateur, Réf. dans MOSS et coll. 1975, RENAUD et coll. 1976, RICHARD et coll. 1978), influençant la sécrétion du LRF par une action directe sur les cellules du noyau arqué et/ou indirectement par l'intermédiaire des cellules des systèmes cholinergiques et aminergiques. Rentrant alors dans un circuit de régulation aux impulsions multiples (positives et négatives), on peut comprendre que lorsqu'on les annihile, dans certains cas, il puisse y avoir un phénomène de compensation suffisant pour rétablir l'équilibre et que dans d'autres cas il y ait échec.

Ches les Primates, les neurones à LRF sont répartis principalement dans l'hypothalamus médiobasal, donnant naissance au tractus hypothalamo-infundibulaire et dans l'hypothalamus rostral, donnant naissance au tractus préoptico-terminal (BARRY et CARETTE 1975, HOFFMAN et coll. 1978, SILVERMAN et coll. 1977, ZIMMERMAN et LOBO-ANTONES 1976, BARRY 1976 c, 1977). A la différence des autres espèces, il existe peu de fibres du tractus hypothalamo-infundibulaire provenant de neurones situés dans l'hypothalamus rostral (BARRY 1979 a). D'autre part, l'hypothalamus médiobasal semble responsable de la sécrétion cyclique de la LH (FERIN et coll. 1977, HESS et coll. 1977, KARSCH et coll. 1973, KNOBIL 1974, KREY et coll. 1975).

En outre, alors que les récepteurs aux oestrogènes sont nombreux dans l'hypothalamus antérieur chez les autres espèces, chez les Primates, la majeure partie de ces récepteurs sont localisés dans l'hypothalamus médiobasal (KEEFER et STUMPF 1975, PFAFF et coll. 1976, WAREMBOURG 1977), y compris ceux qui interviennent dans le contrôle de la sécrétion de LH chez le singe Rhésus femelle (FERIN et coll. 1974). Il faut noter, toutefois, que quelques récepteurs ont été décrits dans l'aire préoptique (PFAFF et coll. 1976).

Des lésions de l'hypothalamus antérieur (NORMAN et coll. 1976) ou sa déafférentation (KOYAMA et coll. 1977) peuvent cependant supprimer l'ovulation et affecter la réponse en LH à l'administration de LRF.

Ainsi, chez le babouin femelle, HAGINO (1980) a constaté une première augmentation de la LH circulante 15 minutes après l'injection de 100 µg de LRF, puis une seconde élévation des taux de LH 90 minutes après (alors que le LRF injecté n'est plus détectable dans le sang) ; or, les animaux dont l'hypothalamus rostral a été déconnecté, ne présentent pas ce second pic de LH (bien que leurs taux d'oestradiol se soient élevés, 30 minutes après l'injection, de la même façon que ceux des singes n'ayant pas de déafférentation frontale).

Les expériences de stimulations semblent également confirmer le rôle de l'hypothalamus rostral dans la régulation de la sécrétion de la LH (SPIES et coll. 1977).

Les résultats de nos dosages, chez le singe écureuil, semblent montrer (une restriction doit être faite car cette observation n'a pu être effectuée que sur 3 animaux) qu'en phase folliculaire moyenne, il existe tout d'abord un pic de LRF dans l'hypothalamus médiobasal. Ce pic est passager et il est suivi d'une augmentation nette du LRF dans l'hypothalamus antérieur. Une telle mise en

charge est également observée dans la lame terminale en immunofluorescence par BARRY (1979 b) et montre l'importance du tractus préoptico-terminal dans la décharge cyclique des gonadotrophines chez cette espèce.

Il se pourrait qu'il y ait tout d'abord, sous l'effet des stéroïdes, une activation principalement des neurones de l'hypothalamus médiobasal ; cette activation, outre une première sensibilisation de l'hypophyse, déclencherait un signal stimulant à leur tour les neurones du tractus préoptico-terminal ; la stimulation de ces neurones conduisant alors à la sécrétion d'une quantité de LRF faible mais durable ; il peut s'agir de LRF destiné également à présensibiliser l'hypophyse (mais il devrait alors agir à l'état extrêmement dilué) ou de LRF dont l'action serait celle d'un neuromodulateur (levant par exemple une inhibition dans une zone hypothalamique où il pourrait accéder telle l'aire préoptique, ou l'aire péricommissurale rostrale) et rentrerait ainsi dans le circuit de régulations dans lequel sont impliqués les autres neurotransmetteurs (avec des effets compensateurs possibles, expliquant les résultats divers des expériences de déafférentations et de destructions).
La deuxième décharge de LRF, proche de l'ovulation, pourrait être principalement le fait d'une seconde impulsion sur les neurones à LRF "stéroïdo-répondants".

Chez le cobaye, d'après nos dosages, un tel schéma serait également possible bien que le décalage que nous observons chez le singe entre la stimulation des neurones à LRF participant au tractus hypothalamo-infundibulaire et celle des neurones du tractus préoptico-terminal n'apparaisse pas ; en effet celle-ci est peut-être masquée par la localisation antérieure des corps cellulaires de la plupart des neurones sur lesquels s'exercerait la rétroaction positive des oestrogènes en relation avec le déclenchement de l'ovulation.

Durant la plus grande partie du cycle oestral, chez le cobaye, un rythme circadien de la sécrétion de l'ACTH semble être maintenu ainsi, d'ailleurs, qu'un rythme circadien de la sécrétion du cortisol.

En effet, on sait que si le rythme de la glande surrénale n'est pas dépendant du rythme circadien des taux plasmatiques d'ACTH, il est normalement en phase avec lui, amplifiant ainsi la réponse de la production d'hormones stéroïdes.

Ce rythme de la glande surrénale n'est pas dû à des variations de la capacité de la glande à synthétiser des stéroïdes, mais à des variations de sa sensibilité à l'ACTH (soit qu'il y ait des modifications de la configuration des récepteurs sur la membrane cellulaire, soit qu'il existe un rythme de l'activation de l'adénylate cyclase) (MASANORI et coll. 1981).

Bien que le cobaye domestique ait tendance à avoir le mode de vie des animaux diurnes, ce rythme circadien, avec des valeurs minimales le matin et maximales en fin d'après-midi, se rapproche de celui que l'on trouve chez le rat et les espèces nocturnes ; en fait, le cobaye a été décrit par ROOD (1972) comme étant un animal crépusculaire ; chez l'homme et les espèces diurnes (KRIEGER 1979) les valeurs sont élevées tôt le matin et minimales le soir.

Durant le prooestrus et l'oestrus, le rythme circadien est masqué par des variations très importantes, tant des taux d'ACTH (décharges pulsatiles de grandes amplitudes), que des taux de cortisol.

Il faut noter cependant que dans nos expériences, nous dosons le cortisol total, or une grande partie du cortisol est sous forme liée. Approximativement 70 p. 100 sont liés à la CBG avec une affinité très grande ; néanmoins d'autres stéroïdes, principalement la progestérone, sont capables de se fixer à la CBG de façon compétitive (CHAN and SLAUNWHITE 1977, STROUPE et coll. 1978) ; mais il n'y a guère que pendant la gestation que les taux de progestérone circulante sont assez élevés pour perturber l'équilibre normal cortisol libre/cortisol-CBG.

Bien que chez le rat, il se pourrait que le complexe corticostérone-CBG puisse passer directement dans la cellule hépatique par pinocytose, se dissocier ensuite et stimuler alors la production d'alanine ou de tyrosine aminotransférases hépatiques (KELLER et coll. 1969, ROSNER 1972), seuls la corticostérone ou le cortisol déjà libres pourraient agir au niveau d'autres organes tel

le pancréas, ou seraient effectifs sur les centres hypothalamiques pour exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de l'ACTH (FORTIER et coll. 1970).

En principe, la CBG joue d'une part un rôle protecteur en préservant le cortisol d'une élimination trop rapide dans les urines, d'autre part un rôle de tampon en maintenant les taux de cortisol libre relativement constants (atténuant ainsi les variations de la sécrétion de cortisol par la glande surrénale sous l'influence de la sécrétion épisodique d'ACTH).

Etant donné que les oestrogènes exogènes stimulent la synthèse de CBG (48 h après leur administration) et que ceci a pour conséquence une augmentation des taux de cortisol lié (et du cortisol total), alors que la fraction libre n'augmenterait que peu ou pas (MILLS et coll. 1960 ; DOE et coll. 1960 ; BRIEN 1975), il se pose le problème de savoir quel est le rôle joué par les oestrogènes endogènes sur les variations des taux de cortisol que nous observons dans nos expériences et si ces variations ne sont pas uniquement le fait de modifications des taux de cortisol lié inactif.

Durant la gestation, les taux de CBG augmentent parallèlement à l'augmentation, dans le sang, des 17-hydroxycorticostéroïdes ; cette augmentation des taux de CBG est alors bien due à une élévation des taux d'oestradiol et d'oestrone, mais,chez la femme, il faut une élévation dépassant un seuil de 1300 pg/ml d'oestradiol et/ou 500 pg/ml d'oestrone pour qu'elle ait un effet sur la CBG (MOORE et coll. 1978 a). L'importance de ces valeurs, qui ne sont pas atteintes au cours du cycle oestral (chez la femme, valeurs maximales de l'ordre de 500 pg/ml FRANCHIMONT 1972, 1973), explique le fait qu'il n'y ait généralement pas de différences significatives observées entre les taux de la CBG chez les mâles et les femelles, sauf chez le rat où des taux plus élevés ont été trouvés chez les femelles par OTTENWELLER et coll.(1979).

Néanmoins ANGELI et coll. 1977, ont noté des valeurs de la CBG plus importantes durant la phase lutéale du cycle menstruel chez la femme (capacité de fixation de 23,3 à 26,8 µg cortisol/100 ml plasma) que durant la phase préfolliculaire (18,3 à 20,1 µg/100 ml) mais il se pourrait que la progestérone ait interféré dans leur dosage, en effet, également chez la femme, DURBER et coll. (1976) et MOORE et coll. (1978 b), n'ont pas constaté de telles variations.

Au cours du cycle oestral chez le cobaye, l'élévation importante de l'oestradiol s'effectue en fin de dioestrus, l'augmentation du cortisol se produit en fin de prooestrus, 2 jours plus tard, c'est-à-dire dans des délais qui pourraient correspondre à une augmentation des taux de la CBG.

Cependant, d'une part les concentrations maximales en oestradiol que nous trouvons en fin de dioestrus dans la circulation générale sont de

70 pg/ml. (JOSHI et coll. 1973, dans le sang de la veine ovarienne, trouvent des concentrations maximales de l'ordre de 200 pg d'oestradiol/ml et de 150 pg d'oestrone/ml) ; ces valeurs restent donc relativement faibles et il est peu probable qu'elles puissent provoquer une augmentation importante de la CBG.

D'autre part l'élévation des taux de cortisol en prooestrus est presque simultanée (légèrement postérieure) aux décharges importantes d'ACTH et semble donc bien être la conséquence directe de celles-ci. Ces résultats sont en accord avec ceux de RAPS et coll. 1971, PHILLIPS et POOLSANGUAN 1978 (augmentation de la corticostérone en prooestrus chez le rat), BUCKINGHAM et coll. 1978 chez le rat (augmentation de l'ACTH et de la corticostérone en prooestrus) et ceux de NICHOLS et CHEVINS (1981) qui, chez la souris, constatent également une élévation de la corticostérone en prooestrus.

Chez le cobaye, nous avons étudié plus précisément le moment de l'ovulation ; ainsi, peu avant l'ovulation, et ceci quelle que soit l'heure à laquelle elle se produit, les taux d'ACTH chutent ; les taux de cortisol sont alors encore élevés mais à l'ovulation, ils sont effondrés chez tous les animaux (et ceci également quelle que soit l'heure). Les variations de l'ACTH et du cortisol semblent donc être parfaitement synchronisées.

Avant que BUCKINGHAM et coll. (1978) n'aient montré que les taux d'ACTH étaient encore élevés dans l'après-midi du prooestrus chez le rat, PHILLIPS et POOLSANGUAN (1978) avaient émis l'hypothèse que la maintenance des taux de corticostérone sanguins serait alors due à la décharge de LH. Même s'il n'est plus utile de retenir cette hypothèse, il est intéressant de noter que ces auteurs ont obtenu, par injection intraveineuse de LH à des rates en metoestrus, une augmentation de la corticostérone plasmatique (en 1 à 2 minutes alors que l'ACTH nécessite un minimum de 3 minutes), confirmant les résultats de VINSON et coll. (1976) qui, in vitro, avaient montré que la LH stimulait la production de corticostérone.

Si les oestrogènes jouent un rôle dans l'augmentation préovulatoire des taux de cortisol, ce ne serait pas par l'intermédiaire d'une action sur la CBG mais plutôt par une action directe sur la sécrétion d'ACTH (les travaux de KITAY 1963, COYNE et KITAY 1969, indiquent qu'ils pourraient stimuler la biosynthèse de l'ACTH et accroître la sensibilité de l'hypophyse au CRF ; mais BUCKINGHAM et HODGES (1977) n'ont pas confirmé ces résultats) ou par une action sur les centres nerveux et l'hypothalamus dont dépend la production de CRF.

Il faut noter que peu après l'ovulation et surtout en début de postoestrus, les taux d'ACTH reprennent momentanément des valeurs élevées ; ceci peut être la conséquence de l'effondrement du cortisol circulant et donc de la levée de l'inhibition qu'il pouvait exercer sur la production de l'ACTH.

L'ensemble de ces résultats montre que chez le cobaye, parallèlement à l'activité "LRF" et à celle de l'axe gonadotrope, il semble bien y avoir une activité très importante de l'axe corticotrope en relation avec la période de l'ovulation et l'ovulation elle-même.

Chez le singe écureuil, les taux de cortisol sanguins sont inhabituellement élevés par rapport aux autres espèces. WILSON et coll. (1978) donnent une concentration moyenne de 112,8 ± 4,8 µg/100 ml chez le mâle avec des valeurs extrêmes, dues à des variations individuelles (et non à un rythme circadien) très éloignées (18,4 µg/100 ml et 332 µg/100 ml). COE et coll. (1978) donnent des valeurs de 181 (67 - 322) µg/100 ml chez le mâle et 103 (37-220) µg/100 ml chez la femelle non stressés, 248 µg/100 ml et 174 µg/100 ml chez les animaux stressés. (Il faut remarquer que ces auteurs trouvent des valeurs plus faibles chez la femelle que chez le mâle, à l'inverse de ce qui se produit chez les autres espèces, KITAY 1961, PARKES et DEANESLEY 1966). BROWN et coll. (1970), ont constaté des taux moyens de 405 µg/100 ml chez les mâles non stressés, de 672 µg/100 ml 10 minutes après capture, et pouvant atteindre 1025 µg/100 ml après le stress prolongé provoqué par une immobilisation d'une heure.

Les valeurs que nous observons chez les femelles au cours du cycle (335 - 417 µg/100 ml) se rapprochent de celles obtenues par BROWN et coll. (1970) chez le mâle non stressé.

Toutes ces valeurs sont nettement supérieures à celles décrites chez le singe Rhésus par MICHAEL et coll. (1974), FELDMANN et BROWN (1976) et chez l'homme par FAIMAN et WINTER (1971), où les taux, en dehors du stress, ne dépassent pas 25 µg/100 ml.

En revanche, d'autres espèces de singes du Nouveau Monde, tels les marmousets, présentent également des taux de cortisol particulièrement élevés (YAMAMOTO et coll. 1977).

Chez les singes écureuils mâles gardés isolés, WILSON et coll. (1978) ont constaté une augmentation des taux de cortisol (170 ± 7,7 µg/100 ml) laissant supposer un certain stress par la non-adaptation à l'environnement ; parallèlement les variations des taux de cortisol liées au rythme circadien apparaissent alors qu'elles sont normalement insignifiantes et il ne se produit pas de diminution des taux d'androgènes.

Les singes femelles de notre expérimentation ont été gardés à 4 par cage ; les coupes histologiques des ovaires témoignent d'un déroulement normal du cycle oestral. Cependant, ces animaux, en captivité, sont fort probablement dans un état de stress relatif assez permanent ; de surcroît, il est difficile, même lorsque le sacrifice est rapide, d'éviter le stress lors de la capture.

On pourrait s'attendre à trouver des taux d'ACTH plasmatiques également particulièrement élevés chez le singe écureuil ; or, ils sont bas :

22 pg/ml chez le mâle, 37 pg/ml chez la femelle (COE et coll. 1978). En effet, ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles que nous observons chez le cobaye alors que les taux de cortisol sont 2,6 à 13 fois plus élevés.

Lors d'un stress important (stress à l'éther décrit par COE et coll. 1979), les taux d'ACTH plasmatiques semblent présenter une augmentation parallèle à celle des taux du cortisol (bien que cette augmentation n'atteigne pas le degré de signification pour tous les animaux) ; or ces mêmes auteurs notent que chez les animaux ayant subi des stress à l'éther ou des prélèvements de sang répétés au cours de plusieurs semaines, il se produit une augmentation des taux de base du cortisol, sans qu'il y ait de modifications apparentes des taux d'ACTH.

Ces résultats montrent la difficulté d'évaluer le taux de base réel du cortisol chez cette espèce et, de ce fait, de mettre en évidence des variations de plus faibles amplitudes que celles produites par le stress.

Bien que les taux de cortisol soient particulièrement élevés et les taux d'ACTH bas, il n'y a ni hypersensibilité de la glande surrénale à l'ACTH (KITTINGER et BEAMER 1968, BROWN et coll. 1970), ni un ralentissement du catabolisme du cortisol ou une activité accrue de la CBG (SEAL et DOE 1965, BROWN et coll. 1970). Etant donné qu'ENGELAND et DALLMAN (1975) ont montré que des éléments nerveux afférents et efférents intervenaient dans la croissance de la surrénale après adrénalectomie unilatérale, on peut supposer l'existence d'un mécanisme supplémentaire de ce type intervenant dans la régulation de la fonction surrénalienne (COE et coll. 1978).

Le singe écureuil est donc un animal dont les taux de cortisol sont particulièrement difficiles à analyser.

Il ne nous a pas été possible de mettre en évidence des variations en relation avec l'ovulation aussi importantes que celles que nous avons décrites chez le cobaye. Néanmoins, bien que les résultats n'aient rien de comparable en netteté, à ceux que nous obtenons chez le cobaye, il semble se produire également, chez le singe écureuil, une chute des taux de cortisol au moment de l'ovulation. Il est possible, donc, que de telles variations existent mais soient masquées par des taux en permanence plus élevés que la normale (sans toutefois atteindre les valeurs d'un stress important), en raison des difficultés d'adaptation des animaux aux conditions de captivité. Il est également possible que chez les Primates, ces variations soient normalement beaucoup plus atténuées que chez les Rongeurs, expliquant le fait qu'elles n'aient pas été décrites chez la femme.

C O N C L U S I O N

I - Mise au point de systèmes de dosages radio-immunologiques de la FSH et de la LH de Cobaye.

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, en effet, les rendements sont de l'ordre de 2 à 3,4 p. 100 pour la FSH et de 10 p. 100 pour la LH. Le sacrifice d'un nombre très élevé de cobayes - qu'il nous était impossible d'obtenir - serait nécessaire pour permettre l'isolement de fractions FSH et LH dépourvues d'activités contaminantes pouvant être utilisées pour la préparation d'immunsérums spécifiques anti FSH ou anti LH de cobaye.

Nous avons donc dû chercher des systèmes hétérologues de dosages radio-immunologiques dans lesquels les gonadotrophines de cobaye entraient en compétition avec le traceur radioactif d'une autre espèce pour se fixer à un antisérum. 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 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 (à 4°C et à température ambiante), soit par la technique d'immunoadsorption ; leur sensibilité est de l'ordre de 0,95 ng de NIAMD rat FSH RP_1 pour le dosage de la FSH et de 0,22 ng de NIAMD rat LH RP_1 pour celui de la LH. Ils ont pu être adaptés pour le dosage de ces hormones dans les sérums des cobayes ; des contrôles ont été effectués sur des dilutions de sérums riches en gonadotrophines, provenant d'animaux castrés ou auxquels du LRF synthétique avait été administré. Chez le cobaye, dans nos dosages, il y a analogie de comportement 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.

Ces systèmes de dosages, de par leur sensibilité et la compétition complète produite par les gonadotrophines de cobaye hypophysaires et sériques

permettent d'exprimer les résultats en unités pondérales des hormones de références standard.

Les gonadotrophines du cobaye semblent présenter une spécificité d'espèce très grande. En effet, bien que DONOVAN et coll. (1975 b) aient décrit également un système de dosage radio-immunologique dans lequel la LH de cobaye présente une réaction croisée complète, dans le système hétérologue utilisé par TERASAWA et coll. 1979, la réaction croisée n'est que partielle et les résultats ont dû être exprimés en poids d'extrait hypophysaire. La spécificité d'espèce de la FSH du cobaye semble être encore plus grande que celle de la LH ; en effet, dans le système utilisé par DONOVAN et coll. (1975 a), la compétition exercée par la FSH sérique du cobaye est incomplète et le système que nous avons mis au point, grâce à un antisérum qui nous a été donné par le Docteur HENDRICK, est le seul décrit à ce jour qui permette le dosage précis de la FSH chez le cobaye.

D'après les premiers essais de fixations que nous avons obtenus, il semblerait également possible d'adapter un système de dosage dans lequel l'antisérum serait un anti FSH humaine.

II - Mise au point de systèmes de dosages radio-immunologiques de la FSH et de la LH de singe écureuil.

La spécificité d'espèce des gonadotrophines du singe écureuil semble également particulièrement importante, même comparée à celle d'autres espèces de singes, expliquant les faibles réactions croisées obtenues dans des systèmes de dosages radio-immunologiques humains par HUMMEL et coll. (1974).

Après de nombreux essais de systèmes hétérologues et homologues humains, nous avons obtenu une réaction croisée très importante des hormones hypophysaires du singe écureuil, jusqu'à provoquer une inhibition de la fixation des hormones marquées humaines de 50 p. 100 pour la FSH et de 64 p. 100 pour la LH, dans des systèmes comprenant un antisérum anti FSH humaine provenant de Calbiochem et un antisérum anti LH humaine provenant du C.E.A. Ces anticorps possèdent cependant une population de sites pour lesquels les gonadotrophines hypophysaires des singes, comparées aux hormones humaines, présentent peu d'affinité.

En revanche, dans ces systèmes, les gonadotrophines sériques du singe écureuil présentent une réaction croisée complète ; des contrôles ont été

effectués sur des dilutions de sérums provenant d'animaux castrés ou auxquels du LRF synthétique avait été administré.

Il est possible de détecter des activités correspondant à 1 mUI de FSH/ml de sérum et 0,5 mUI de LH/ml.

Chez le singe écureuil, il y a donc une différence très nette d'immunoréactivité entre la FSH et la LH hypophysaires et la FSH et la LH sériques.

III - Mise au point d'un dosage radio-immunologique du LRF tissulaire.

Nous avons décrit deux types de séparation du LRF marqué à l'^{125}Iode par la méthode à la chloramine T de GREENWOOD et coll. 1963, des sels minéraux radioactifs restés libres : la première par chromatographie sur Séphadex G 25, la seconde par chromatographie sur QAE-Séphadex A-25. Nous avons retenu cette seconde méthode, que nous avons adaptée à partir de celle décrite par NETT et ADAMS 1977, car elle permet de recueillir des fractions enrichies en LRF monoiodé.

Toutefois cette hormone marquée ne confère pas au dosage les performances (sensibilité de 0,4 pg) décrites par CARATY et coll. (1980) avec le même antisérum mais avec du LRF monoiodé ayant subi une étape supplémentaire de purification (électrophorèse en gel de polyacrylamide). Mais elle permet néanmoins d'obtenir rapidement de très bons résultats.

En effet, grâce à un antisérum anti LRF de synthèse qui nous a été donné par le Pr. DUBOIS, nous obtenons ainsi un dosage spécifique du LRF, dont la sensibilité est de 2 à 3 pg.

IV - Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope au cours du cycle oestral chez le cobaye.

Alors que dans les expériences de déconnexions décrites par TERASAWA et WIEGAND (1978) chez le cobaye, l'hypothalamus médiobasal semblait seul être impliqué dans le contrôle de la décharge préovulatoire de la LH, nous mettons en évidence des variations des taux de LRF, proportionnellement plus importantes dans l'hypothalamus antérieur que dans l'hypothalamus médiobasal, aussi bien lors de la mise en charge en prooestrus (augmentation d'un facteur 2,5 dans l'hypothalamus antérieur et 1,9 dans l'hypothalamus médiobasal) que lors de la chute des taux au moment de l'ovulation (chute à des valeurs respectivement 4,4 fois et 2,9 fois moins élevées).

La participation des neurones à LRF de l'hypothalamus rostral à la régulation de la sécrétion cyclique de la LH semble donc très probable chez le cobaye.

Cette activation des neurones à LRF de l'hypothalamus antérieur peut concerner :

- d'une part les neurones dont les axones se projettent vers l'éminence médiane
- d'autre part les neurones du tractus préoptico-terminal. Si le LRF élaboré par ces neurones ne constitue qu'une partie assez faible du LRF total, il se pourrait que leur activation au cours du prooestrus soit particulièrement importante, conduisant à une sécrétion de LRF multipliée par 2,5 à 10 fois par rapport au stade de repos.

Nous avons montré, chez le cobaye, l'existence d'un premier pic de LRF le jour qui précède la décharge préovulatoire de LH (LRF qui pourrait être destiné à effectuer une première sensibilisation de l'hypophyse), puis d'un second pic peu avant la décharge préovulatoire de LH, et qui se maintient relativement élevé jusqu'à l'ovulation. Une chute dramatique des taux de LRF hypothalamique se produit à l'ovulation, peu après le pic préovulatoire de progestérone (pic d'amplitude d'ailleurs très importante chez le cobaye). La progestérone pourrait ainsi exercer une action biphasique sur la décharge préovulatoire de LH : d'abord facilitante, en synergie avec l'oestradiol (dont les taux sont élevés en fin de dioestrus et en prooestrus) puis inhibitrice en provoquant, ainsi que l'ont suggéré SARKAR et FINK (1979), l'"extinction" de la décharge de LRF.

Chez le cobaye, il apparaît une dissociation particulièrement nette des taux sériques de LH et de FSH. Nous l'avions également constaté lors d'études concernant la période post-natale et la castration (CROIX 1976, 1977). Au cours du cycle oestral, la décharge brève et importante préovulatoire de LH précède nettement l'augmentation des taux de FSH (ce qui est parfois également observé chez la femme, FRANCHIMONT et coll. 1973). Pour BARRACLOUGH et coll. (1979), l'hypophyse pourrait répondre à une forte et brusque décharge de LRF par une sécrétion de LH alors que la sécrétion de FSH serait induite par des concentrations en LRF faibles mais prolongées.

Alors que nous observons une accumulation de LH hypophysaire peu avant la cession de LH dans le sang, nous ne constatons pas d'élévation comparable des taux de la FSH hypophysaire précédant (ou accompagnant) une décharge importante de FSH. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse de CHAPPEL (1981) concernant la dualité de forme de la FSH hypophysaire, l'une correspondant à la forme de stockage, l'autre à la forme d'excrétion ; il se pourrait qu'il y ait donc pluralité

de formes de la FSH et que certaines, correspondant à des étapes intermédiaires, soient incapables de se fixer aux anticorps que nous utilisons dans nos dosages.

V - Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope au cours du cycle oestral chez le singe écureuil.

Chez le singe écureuil, outre une activation des neurones à LRF de l'hypothalamus médiobasal en phase folliculaire moyenne et tardive, nous avons montré une augmentation proportionnellement importante des taux de LRF dans l'hypothalamus antérieur (taux multipliés par 11,4). Ces résultats, de même que les variations de charges observées par BARRY (1979 b) dans la lame terminale en immunofluorescence, confirment l'implication des neurones du tractus préoptico-terminal dans le contrôle de la sécrétion cyclique de la LH.

On peut émettre l'hypothèse d'un mécanisme d'action selon lequel il se produirait tout d'abord, sous l'effet des stéroïdes, une activation des neurones du tractus préoptico-infundibulaire, activation qui pourrait, d'une part sensibiliser l'hypophyse à une action future du LRF, d'autre part déclencher un signal stimulant à leur tour les neurones du tractus préoptico-terminal, neurones qui élaboreraient alors du LRF dont l'action serait essentiellement celle d'un neuromodulateur. Sous l'effet d'une nouvelle impulsion des stéroïdes, la seconde décharge importante de LRF se produirait, induisant alors la cession préovulatoire de LH par l'antéhypophyse.

Ce schéma pourrait également être valable pour le cobaye.

Nous avons également défini, chez le singe écureuil, les variations cycliques des gonadotrophines et de la progestérone ; leur séquence est proche de celle observée chez la femme.

VI - Activité de l'axe corticotrope au cours du cycle oestral chez le cobaye et le singe écureuil.

Chez le cobaye, les sécrétions de l'ACTH et du cortisol suivent un rythme circadien correspondant à celui des animaux nocturnes avec des valeurs minimales le matin et maximales en fin d'après-midi.

Nous avons mis en évidence des décharges pulsatiles importantes d'ACTH dans le sang durant la période préovulatoire (accompagnées d'une élévation

également importante des taux du cortisol) ; cette augmentation de la sécrétion d'ACTH en prooestrus est déclenchée parallèlement à l'augmentation des taux hypothalamiques de LRF que nous avons décrite et peut traduire une activation des neurones à CRF se produisant simultanément à celle des neurones à LRF. Dans ce domaine l'isolement tout récent du CRF par VALE et coll. (1981), va probablement permettre de progresser rapidement. Peu avant l'ovulation, les taux d'ACTH plasmatiques s'effondrent, suivis, à l'ovulation, d'une chute du cortisol. Il y a donc une concordance très nette entre les variations des taux du cortisol et celles de l'ACTH.

Ces variations révèlent, chez le cobaye, des modifications importantes de l'activité de l'axe corticotrope en relation avec la période de l'ovulation et l'ovulation elle-même.

Chez le singe écureuil, ainsi que l'ont également observé BROWN et coll. (1970), WILSON et coll. (1978) et COE et coll. (1978), les taux de cortisol sont en permanence relativement élevés ; ceci pourrait être la conséquence d'un certain état de stress produit par la captivité, mais rend l'évaluation du taux de base réel du cortisol très difficile, de même que l'interprétation des variations d'assez faibles amplitudes constatées au cours du cycle oestral. Cette caractéristique est d'ailleurs également rencontrée chez d'autres singes d'Amérique du Sud, tels les marmousets, mais non chez les singes de l'Ancien Monde.

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

ABRAHAM G.E. - BUSTER J.E. and TELLER R.C. (1972) : "Radioimmunoassay of plasma cortisol". Anal. Lett. 5 : 757.

ABRAHAM G.E. - SWERDLOFF R. - TULCHINSKY D. and ODELL W.D. (1971) : Radioimmunoassay of plasma progesterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 32 : 619-624.

AIYER M.S. - CHIAPPA S.A. and FINK G. (1974) : A priming effect of luteinizing hormone releasing factor on the anterior pituitary gland in the female rat. J. Endocrinol. 62 : 573-588.

AIYER M.S. - CHIAPPA S.A. - FINK G. and GREIG F. (1973) : A priming effect of luteinizing hormone releasing factor in the anterior pituitary gland in the female rat. J. Physiol. (Lond.) 234 : 81P - 82P.

ANGELI A. - FRAJRIA R. - BISBOCCI D. and CERESA F. (1977) : Temporal changes in plasma transcortin (C.B.G.) binding capacity during the menstrual cycle. J. Interdis. Cycle Res. 8 : 237-242.

ARAKI S. - FERIN M. - ZIMMERMAN E.A. and VAN DE WIELE R.L. (1975) : Ovarian modulation of immunoreactive gonadotropins releasing hormone (GN-RH) in the rat Brain. Evidence for a differential effect on the anterior and mid hypothalamus. Endocrinology 96 : 644-650.

ARIMURA A. and SCHALLY A.V. (1971) : Augmentation of pituitary responsiveness to LH releasing hormone (LH-RH) by estrogen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136 : 290-293.

ARIMURA A. - SATO H. - KUMASAKA T. - WOROBEC R.B. - DEBELJUK L. - DUNN J. and SCHALLY A.V. (1973) : Production of antiserum to LH-Releasing Hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits development of radioimmunoassay for LH-RH. Endocrinology 93 : 1092-1103.

ATTARDI B. (1981) : Facilitation and inhibition of the estrogen induced luteinizing hormone surge in the rat by progesterone : Effects on cytoplasmic and nuclear estrogen receptors in the hypothalamus - preoptic area, pituitary and uterus. Endocrinology 108 : 1687-1695.

AXELSON J.F. - GERALL A.A. and ALBERS H.E. (1981) : Effect of progesterone on the estrous activity cycle of the rat. Physiol. Behav. 26 : 631-635.

BAKER P.F. and RINK T.J. (1975) : Catecholamine release from bovine adrenal medulla in response to maintained depolarization. J. Physiol. 253 : 593.

BALDWIN D.M. and SAWYER C.H. (1979) : Light synchronization of the preovulatory LH surge in adrenalectomized rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161 : 295-298.

BALLARD P.L. - BAXTER J.D. - HIGGINS S.J. - ROUSSEAU G.G. and TOMKINS G.M. (1974) : General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues. Endocrinology 94 : 998-1002.

BARR G.D. and BARRACLOUGH C.A. (1978) : Temporal changes in medial basal hypothalamic LH-RH correlated with plasma LH during the rat estrous cycle and following electrochemical stimulation of the medial preoptic area in pentobarbital treated pro estrous rats. Brain Res. 148 : 413-423.

BARRACLOUGH C.A. and GORSKI R.A. (1961) : Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen induced sterility in the female rat. Endocrinology 68 : 68-79.

BARRACLOUGH C.A. - COLLU R. - MASSA R. and MARTINI L. (1971) : Temporal interrelationships between plasma LH, ovarian secretion rates and peripheral plasma progestin concentrations in the rat : Effects of nembutal and exogenous gonadotropins. Endocrinology 88 : 1437-1447.

BARRACLOUGH C.A. - WISE P.M. - TURGEON J. - SHANDER D. - DE PAULO L. and RANCE N. (1979) : Recent studies on the regulation of pituitary LH and FSH secretion. Biol. Reprod. 20 : 86-97.

BARRY J. (1954) : Neurocrinie et synapses neurosécrétrices. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 43 : 310-320.

BARRY J. (1976 a) : Characterization and topography of LH-RH neurons in the rabbit. Neurosci. Lett. 2 : 201-205.

BARRY J. (1976 b) : Mise en évidence par immunofluorescence de neurones élaborateurs de LRF dans le télencéphale et le mésencéphale chez les Mammifères. C.R. Acad. Sci. (Paris) 283 : 1531-1533.

BARRY J. (1976 c) : Characterization and topography of LH-RH neurons in the human brain. Neurosci. Lett. 3 : 287-291.

BARRY J. (1977) : Immunofluorescence study of LRF neurons in man. Cell. Tissue Res. 181 : 1-14.

BARRY J. (1978) : Extra-hypophyseal immunoreactive LH-RH pathways in primates. Int. Symp. Neuroendocrinol. Regul. Mech. 1979 : 13-250.

BARRY J. (1979 a) : Immunohistochemistry of luteinizing hormone - releasing hormone - producing neurons of the vertebrates. Int. Rev. Cytol. 60 : 179-221.

BARRY J. (1979 b) : Modifications périodiques du tractus préoptico-terminal à LRH chez le singe écureuil femelle au cours du cycle oestral. Ann. Endocrinol. (Paris) 40 : 191-202.

BARRY J. (1980) : Immunofluorescence study of LRH producing neurons in prosimians (TUPAIA and GALAGO). Cell. Tissue Res. 206 : 355-365.

BARRY J. and CARETTE B. (1975) : Immunofluorescence study of LRF neurons in Primates. Cell. Tissue Res. 164 : 163-178.

BARRY J. and CROIX D. (1978) : Immunofluorescence study of the hypothalamo-infundibular LRH tract and serum gonadotropin levels in the female squirrel monkey during the estrous cycle. Cell. Tissue Res. 192 : 215-226.

BARRY J. et DUBOIS M.P. (1973 a) : Etude en immunofluorescence des structures hypothalamiques à compétence gonadotrope. Ann. Endocrinol. 34 : 735-742.

BARRY J. et DUBOIS M.P. (1973 b) : La voie préoptico-infundibulaire à LH-RH chez le cobaye au cours de la gestation. C.R. Soc. Biol. 167 : 1812-1815.

BARRY J. et DUBOIS M.P. (1974 a) : 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. Brain Res. 67 : 103-113.

BARRY J. and DUBOIS M.P. (1974 b) : Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway of the guinea-pig during the oestrus cycle. Neuroendocrinology 15 : 200-208.

BARRY J. and DUBOIS M.P. (1976) : Immunoreactive LRF neurosecretory pathways in mammals. Acta Anat. 94 : 497-503.

BARRY J. et POULAIN P. (1976) : Etude en immunofluorescence des neurones à LH-RH du singe écureuil après administration de prolactine hautement purifiée. J. Physiol. (Paris) 72 : 14 B (abstr.).

BARRY J. - CROIX D. and POULAIN P. (1978) : Immunofluorescence study of LRH reactive neurons in male squirrel monkeys after intraventricular cerebral injections of highly purified human prolactin. In "Progress in Prolactin Physiology and Pathology" (ROBYN C. and HARTER M. eds) Elsevier Amsterdam. 253-263.

BARRY J. - DUBOIS M.P. and CARETTE B. (1974) : Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway in normal, castrated and testosterone-treated male guinea-pig. Endocrinology 95 : 1416-1423.

BARRY J. - DUBOIS M.P. and POULAIN P. (1973 c) : LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. Z. Zellforsch. 146 : 351-366.

BARRY J. - POULAIN P. et CARETTE B. (1976 a) : Systématisation et efférences des neurones à LRH chez les Primates. Ann. Endocrinol. 37 : 227-234.

BARRY J. - POULAIN P. et CARETTE B. (1976 b) : Recherches en immunofluorescence sur le conditionnement des neurones à LH-RH chez les Primates. In "Neuroendocrinologie" (R. MORNEX, éd.) INSERM Paris : 263-269.

BEAUVILLAIN J.C. - TRAMU G. and CROIX D. (1980) : Electron microscopic localization of enkephalin in the median eminence and the adenohypophysis of the guinea-pig. Neuroscience 5 : 1705-1716.

BENOIT J. and ASSENMACHER I. (1955) : J. Physiol. (Paris) 47 : 427.

BESSER G.M. - ORTH D.N. - NICHOLSON W.E. - BYYNY R.L. - ABE K. and WOODHAM J.P. (1971) : Dissociation of the disappearance of bioactive and radioimmunoreactive ACTH from plasma in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 32 : 595-603.

BLAKE C.A. (1976) : Stimulation of the proestrus luteinizing hormone surge after infusion of LH releasing hormone in phenobarbital - blocked rats. Endocrinology 98 : 451-460.

BLAKE C.A. (1977) : A medial basal hypothalamic site of synergistic action of estrogen and progesterone on the inhibition of pituitary luteinizing hormone release. Endocrinology 101 : 1130-1134.

BLAKE C.A. - NORMAN R.L. and SAWYER C.H. (1974) : Localization of inhibitory actions of estrogen and nicotine on release of luteinizing hormone in rats. Neuroendocrinology 16 : 22-42.

BLATCHLEY F.R. - DONOVAN B.T. and TER HAAR M.B. (1976) : Plasma progesterone and gonadotrophin levels during the estrous cycle of the guinea-pig. Biol. Reprod. 15 : 29-38.

BORGEAT P. - CHAVANCY G. - DUPONT A. - LABRIE F. - ARIMURA A. and SCHALLY A.V. (1972) : Stimulation of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by synthetic luteinizing hormone - releasing hormone-follicle-stimulating hormone-releasing hormone (LHRH/FSH-RH). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 : 2677-2681.

BORGEAT P. - LABRIE F. - COTE J. - RUEL F. - SCHALLY A.V. - COY D.H. - COY E.J. and YANAIHARAN N. (1974) : Parallel stimulation of cyclic AMP accumulation and LH and FSH release by analogs of LH-RH in vitro. J. Mol. Cell. Endocrinol. 1 : 7-20.

BOUCHAUD C. (1975) : Données ultrastructurales sur la perméabilité des capillaires des organes circumventriculaires du cerveau. J. Microsc. Biol. Cell. 24 : 45-58.

BRADBURY M.W.B. - BURDEN J. - HILLHOUSE E.W. - JONES M.T. (1974) : Stimulation electrically and by acetylcholine of the rat hypothalamus «in vitro» J. Physiol. (Lond.) 239 : 269-283.

BRIEN T.G. (1975) : Cortisol metabolism after oral contraceptives : total plasma cortisol and the free cortisol index. Brit. J. Obstet. Gynaecol. 82 : 987-991.

BROWN G.M. - GROTA L.J. - PENNEY D.P. and REICHLIN S. (1970) : Pituitary-adrenal function in the squirrel monkey. Endocrinology 86 : 519-529.

BROWN P.S. (1971) : Pituitary follicle stimulating hormone in immature guinea-pigs and hamsters and in female rats after neonatal treatment with testosterone. J. Reprod. Fert. 27 : 187-192.

BUCKINGHAM J.C. and HODGES J.R. (1977) : The use of corticotrophin production by adenohypophysial tissue in vitro for the detection and estimation of potential corticotrophin releasing factors. J. Endocrinol. 72 : 187-193.

BUCKINGHAM J.C. - HODGES J.R. (1979) : Hypothalamic receptors influencing the secretion of corticotrophin releasing hormone in the rat. J. Physiol. (Lond.) 290 : 421-431.

BUCKINGHAM J.C. - DOHLER K.D. and WILSON C.A. (1978) : Activity of the pituitary-adrenocortical system and thyroid gland during the oestrous cycle of the rat. J. Endocrinol. 78 : 359-366.

BUTLER J.F.M. and DONOVAN B.T. (1971) : The effects of surgical isolation of the hypothalamus upon reproduction in the female guinea-pig. J. Endocrinol. 50 : 507-514.

BUTT W.R. and LYNCH S.S. (1972) : Human pituitary FSH. Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophysaires. 82-91.

BUTT W.R. - CROOKE A.C. and CUNNINGHAM F.J. (1959) : The use of ion-exchange materials in the fractionation of gonadotrophins from urine. Acta Endocrinol. (Copenh.) 32 : 509-518.

BUTT W.R. - CROOKE A.C. and CUNNINGHAM F.J. (1961) : Studies on human urinary and pituitary gonadotrophins. Biochem. J. 81 : 596-605.

CAHILL C.L. and HART K.M. (1969) : Sedimentation velocity and equilibrium characteristics of ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta 194 : 227-233.

CAHILL C.L. - SHETLAR M.R. - PAYNE R.W. - ENDECOTT B. and LI Y.T. (1968) : Isolation and characterization of ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta 154 : 40-52.

CAMPBELL G.T. - BLAIR E.D. - GROSSMAN G.H. - MILLER A.E. - SMALL M.E. and BOGDANOVE E.M. (1978) : Distribution and disappearance of radioimmunoassayable circulating luteinizing hormone in the rat : An apparent difference between stored and released forms of the hormone. Endocrinology 103 : 674-682.

CARATY A. - De REVIERS M.M. - PELLETIER J. - DUBOIS M.P. (1980) : Reassessment of LRF radioimmunoassay in the plasma and hypothalamic extracts of rats and rams. Reprod. Nutr. Develop. 20 : 1489-1501.

CARMEL P.W. - ARAKI S. and FERIN M. (1976) : Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys. Evidence for pulsatile release of gonadotropin releasing hormone (GnRH). Endocrinology 99 : 243-248.

CASTRO-VASQUEZ A. and Mc CANN S.M. (1975) : Cyclic variations in the increased responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) indicated by LH-RH. Endocrinology 97 : 13-19.

CHALLIS J.R.G. - HEAP R.B. and ILLINGWORTH D.V. (1971) : Concentrations of oestrogens and progesterone in the plasma of non pregnant and lactating guinea-pigs. J. Endocrinol. 51 : 333-345.

CHAN D.W. and SLAUNWHITE W.R. (1977) : The chemistry of human transcortin. The effects of pH, urea, salt and temperature on the binding of cortisol and progesterone. Arch. Biochem. Biophys. 182 : 437-442.

CHAPPEL S.C. (1981) : The presence of two species of follicle stimulating hormone within Hamster anterior pituitary glands as disclosed by concanavalin A chromatography. Endocrinology 109 : 935-942.

CHEUNG C.Y. and DAVIDSON J.M. (1977) : Effects of testosterone implants and hypothalamic lesions on luteinizing hormone regulation in the castrate male rat. Endocrinology 100 : 292-302.

CHIAPPA S.A. - FINK G. (1977) : Hypothalamic luteinizing hormone releasing factor and corticotropin activity in relation to pituitary and plasma hormone levels in male and female rats. J. Endocrinol. 72 : 195-210.

CHRISTIAN J.J. (1971) : Population density and reproductive efficiency. Biol. Reprod. 4 : 248-294.

COE C.L. - MENDOZA S.P. - DAVIDSON J.M. - SMITH E.R. - DALLMAN M.F. and LEVINE S. (1978) : Hormonal response to stress in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). Neuroendocrinology 26 : 367-377.

COHEN I.R. and MANN D.R. (1979) : Seasonal changes associated with puberty in female rats. Effect of photoperiod and ACTH administration. Biol. Reprod. 20 : 757-762.

COHEN I.R. and MANN D.R. (1981) : Influence of corticosterone on the response to gonadotropin releasing hormone in rats. Neuroendocrinology 32 : 1-6.

COOPER K.J. - FAWCETT C.P. and Mc CANN S.N. (1974) : Inhibitory and facilitatory effects of estradiol-17 β on pituitary responsiveness to a luteinizing hormone-follicle stimulating hormone releasing factor (LH-RF/FSH-RF) preparation in the ovariectomized rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145 : 1422-1426.

COYNE M.D. and KITAY J.I. (1969) : Effect of ovariectomy on pituitary secretion of ACTH. Endocrinology 85 : 1095-1102.

CROIX D. (1976 a) : Variations des taux sériques de LH et de FSH durant la période post-natale chez le cobaye. C.R. Acad. Sci. (Paris) 282 : 649-651.

CROIX D. (1976 b) : Mise au point de dosages radio-immunologiques des gonadotrophines FSH et LH de cobaye. Applications à l'étude de la période post-natale, du cycle oestral et de la castration. Thèse Doctorat 3ème cycle Biochimie Université de Lille I, n° 585.

CROIX D. (1977 a) : Effects of castration on serum LH and FSH concentrations in male guinea-pigs. J. Reprod. Fert. 51 : 149-151.

CROIX D. (1977 b) : Mise au point des dosages radio-immunologiques de LH et de FSH chez le cobaye. Applications biologiques. Lille Médical 22 : 29-33.

CROIX D. (1982 a) Changes in anterior and medial basal hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (Gn RH) correlated with serum LH and progesterone during the estrus cycle of the guinea-pig. Soumis pour publication.

CROIX D. (1982 b) : Changes in hypothalamic Gn RH content and serum levels of gonadotropins and progesterone during the estrus cycle of the squirrel monkey. Soumis pour publication.

CROIX D. (1982 c) : Changes in the blood levels of ACTH and cortisol in relation with ovulation in the guinea-pig. Soumis pour publication.

CROIX D. and FRANCHIMONT P. (1975) : Changes in the serum levels of the gonadotropins, progesterone and estradiol during the estrus cycle of the guinea-pig. Neuroendocrinology 19 : 1-11.

CROIX D. - HENDRICK J.C. - BALTHAZART J. et FRANCHIMONT P. (1974) : Dosage radioimmunologique de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) hypophysaire de canard à l'aide d'un système de mammifères. C.R. Soc. Biol. 168 : 136-140.

DEBELJUK L. - ARIMURA A. and SCHALLY A.V. (1972) : Effect of estradiol and progesterone on the LH release induced by LH-releasing hormone (LH-RH) in intact diestrous rats and anestrous ewes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139 : 774-777.

DE KONING J. - VAN DIETEN JAMJ - VAN REES G.P. (1978) : Refractoriness of the pituitary gland after continuous exposure to luteinizing hormone releasing hormone. J. Endocrinol. 79 : 311-318.

DE LA LLOSA P. (1972) : Gonadotrophines hypophysaires animales, LH et FSH structure chimique et relation structure primaire, activité biologique. Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophysaires : 93-116.

DE LA LLOSA P. and JUTISZ M. (1969) : Reversible dissociation into sub units and biological activity of ovine luteinizing hormone. Biochim. Biophys. Acta 181 : 426.

DE LA LLOSA P. - COURTE C. and JUTISZ M. (1967) : On the mechanism of reversible inactivation of luteinizing hormone by urea. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26 : 411-416.

DEN HOLLANDER F.C. and SCHUURS A.H.W.M. (1971) : Radioimmunoassay methods. Discussion ; in KIRKHAM and HUNTER p. 419 (Churchill Livingstone ; London).

DE PAOLO L.V. and BARRACLOUGH C.A. (1979) : Interactions of estradiol and progesterone on pituitary gonadotropin secretion : possible sites and mechanism of action. Biol. Reprod. 20 : 1173-1185.

DERIVAUX J. - ECTORS F. - HENDRICK J.C. et FRANCHIMONT P. (1975) : Détermination de la FSH plasmatique chez les bovins. Ann. Endocrinol. 35 : 614-621.

DOE R.P. - ZINNEMAN H.H. - FLINK E.B. and ULSTROM R.A. (1960) : Significance of the concentration of non-protein bound plasma cortisol in normal subjects, Cushing's syndrome, pregnancy and during oestrogen therapy. J. Clin. Endocrinol. 20 : 1484-1492.

DONOVAN B.T. - Ter HAAR M.B. - LOCKHART A.N. - Mac KINNON P.C.B. - MATTOCK J.M. and PEDDIE M.J. (1975 a) : Changes in the concentration of luteinizing hormone in plasma during development in the guinea-pig. J. Endocrinol. 64 : 511-520.

DONOVAN B.T. - Ter HAAR M.B. - LOCKHART A.N. and PEDDIE M.J. (1975 b) : Changes in the concentration of follicle stimulating hormone in plasma during development in the guinea-pig. J. Endocrinol. 64 : 521-528.

DROUIN J. - LAGACE L. and LABRIE F. (1976) : Estradiol-induced increase of the LH responsiveness to LH-RH in anterior pituitary cells in culture. Endocrinology 99 : 1477-1481.

DUBOIS M.P. (1973) : Localization by immunofluorescence of LH-RF in the nervous structure of the ram, boar and bull. J. Reprod. Fertil. 35 : 595.

DUBOIS M.P. (1976) : Immunological evidence of LH-RF in hypothalamus and median eminence : A review. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 16 : 177-194.

DUFAU M.L. - HODGEN G.D. - GOODMAN A.L. and CATT K.J. (1977) : Bioassay of circulating luteinizing hormone in the Rhesus monkey : Comparison with radioimmunoassay during physiological changes. Endocrinology 100 : 1557-1565.

DUFY-BARBE L. - FRANCHIMONT P. and FAURE J.M.A. (1973) : Time course of LH and FSH release after mating in the female rabbit. Endocrinology 92 : 1318-1321.

DUFY-BARBE L. - HENDRICK J.C. - FRANCHIMONT P. et FAURE J.M.A. (1972) : Dosage radio-immunologique par immunoadsorbant des gonadotrophines FSH et LH de lapin ; applications physiologiques. Ann. Endocrinol. 33 : 481-491.

DUPOUY J.P. - CHATELAIN A. and GODAUT M. (1980) : Influences of heparin on ACTH distribution and immunoreactivity in plasma of the rat. In vivo and in vitro studies. J. Physiol. (Paris) 76 : 631-635.

DURBER S.M. - LAWSON J. and DALY J.R. (1976) : The effect of oral contraceptives on plasma cortisol and cortisol binding capacity throughout the menstrual cycle in normal women. Brit. J. Obstet. Gynaecol. 83 : 814-818.

EKBLAD M. - BEWLEY T.A. and PAPKOFF H. (1970) : Circular dichroism studies on ovine follicle stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta 221 : 142-145.

ENGELAND W.C. and DALLMAN M.F. (1975) : Compensatory adrenal growth is neurally mediated. Neuroendocrinology 19 : 352-362.

FAIMAN C. and WINTER J.S.D. (1971) : Diurnal cycles in plasma FSH, testosterone and cortisol in Men. J. Clin. Endocrinol. 33 : 186-192.

FEDER H.H. - BROWN-GRANT K. and CORKER C.S. (1971) : Preovulatory progesterone, the adrenal cortex and the "critical period" for luteinizing hormone release in rats. J. Endocrinol. 50 : 29-39.

FEDER H.H. - RESKO J.A. and GOY R.W. (1968) : Progesterone concentrations in the arterial plasma of guinea-pigs during the oestrus cycle. J. Endocrinol. 40 : 505-513.

FELDMAN H. and ROBBARD D. (1971) : Mathematical theory of radioimmunoassay, in W.D. ODELL and W.H. DAUGHADAY. Principles of competitive binding assays. Lippincott, Phil., 158.

FELDMANN J. and BROWN G.M. (1976) : Endocrine responses to electric shock and avoidance conditioning in the Rhesus monkey cortisol and growth hormone. Psychoneuroendocrinol. 1 : 231-242.

FERIN M. - ANTUNES J.L. - ZIMMERMAN E. - DYRENFRUTH I. - FRANTZ A.G. - ROBINSON A. and CARMEL P.W. (1977) : Endocrine function in female Rhesus monkeys after hypothalamic disconnection. Endocrinology 101 : 1611-1620.

FERIN M. - CARMEL P.W. - ZIMMERMAN E.A. - WARREN M. - PEREZ R. and VAN DE WIELE R.L. (1974) : Localization of intrahypothalamic estrogen responsive sites influencing LH secretion in the female Rhesus monkey. Endocrinology 95 : 1059-1068.

FERIN M. - ROSENBLATT H. - CARMEL P.W. - ANTUNES J.L. and VAN DE WIELE R.L. (1979) : Estrogen induced gonadotropin surges in female Rhesus monkeys after pituitary stalk section. Endocrinology 104 : 50-52.

FINK G. - CHIAPPA S.A. and AIYER M.S. (1976) : Priming effect of luteinizing hormone releasing factor elicited by preoptic stimulation and by intravenous infusion and multiple injections of the synthetic decapeptide. J. Endocrinol. 69 : 359-372.

FLEISCHER N. and RAWLS W.E. (1970) : ACTH Synthesis and release in pituitary monolayer culture : Effect of dexamethasone. Amer. J. Physiol. 219 : 445-448.

FLERKO B. (1957 a) : Effect of experimental hypothalamic lesions on inhibition of luteinization induced indirectly by the follicle stimulating hormone. Endokrinologie (Leipzig) 34 : 202-208.

FLERKO B. (1957 b) : Role of hypothalamic structures in the inhibitory action of folliculin on secretion of follicle stimulating hormone. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp. 46 : 159-172.

FLERKO B. (1962) : In "Hypothalamic Control of the anterior pituitary" (SZENTAGOTHAI J., FLERKO B., MESS B. and HALASZ B., eds) : 192-265, Akademiai Kiado Budapest.

FLERKO B. and BARDOS V. (1960) : Pituitary hypertrophy after anterior hypothalamic lesion. Acta Endocrinol. 35 : 375-380.

FLERKO B. and SZENTAGOTHAI J. (1957) : Oestrogen sensitive nervous structures in the hypothalamus. Acta Endocrinol. 26 : 121-127.

FOLLET B.K. - SCANES C.G. and NICHOLLS J.J. (1972) : The chemistry and physiology of the avian gonadotropins. Colloque INSERM.Hormones glycoprotéiques hypophysaires : 193-211.

FORTIER C. - DELGADO A. - DUCOMMUN P. - DUCOMMUN S. - DUPONT A. - JOBIN M. - KRAICER J. - MACINTOSH-HATT B. - MARCEDD H. - MIALHE P. - MIALHE-VOLOSS C. - CERUP C. et VAN REES G.P. (1970) : Can. Med. Ass. J. 103 : 864.

FRANCHIMONT P. (1964) : Etude du dosage de certaines hormones hypophysaires. Vol. 1 141 (Arscia Bruxelles ; Maloine Paris).

FRANCHIMONT P. (1966) : Le dosage des hormones hypophysaires somatotrope et gonadotropes et son application clinique. (Arscia Bruxelles ; Maloine Paris).

FRANCHIMONT P. (1971) : Sécrétion normale et pathologique de la somatotrophine et des gonadotrophines humaines. Masson et Cie, Eds, Paris.

FRANCHIMONT P. (1972) : Human gonadotrophin secretion. J. Roy. Coll. Physicians (Lond.) 6 : 283-298.

FRANCHIMONT P. et LEGROS J.J. (1971) : L'exploration pratique des fonctions hypophysaires. Rev. Méd. (Liège) XXVI : 149-155.

FRANCHIMONT P. - CHARI S. and DEMOULIN A. (1975 a) : Hypothalamus pituitary testis interaction. J. Reprod. Fert. 44 : 335-350.

FRANCHIMONT P. - CHARI S. - HAGELSTEIN M.T. and DURAISWAMI S. (1975 b) : Existence of a follicle stimulating hormone inhibiting factor "inhibin" in bull seminal plasma. Nature (Lond.) 257 : 402-404.

FRANCHIMONT P. - DEMEY-PONSART L. et LEGROS J.J. (1973) : Thérapeutiques hormonales actuelles en gynécologie. Les gonadotrophines au cours du cycle menstruel. Rev. Méd. (Liège) XXVIII : 105-111.

FRANCHIMONT P. - DEMOULIN A. - VERSTRAELEN-PROYARD J. - HAZEE-HAGELSTEIN M.T. and TUNBRIDGE W.M.G. (1979) : Identification in human seminal fluid of an inhibin like factor with selectively regulates FSH secretion. J. Reprod. Fert. Suppl. 26 : 123-133.

FRAWLEY L.S. - DAILEY R.A. - TINDALL G.T. and NEIL J.D. (1981) : Increased LH secretory response to LH-RH after hypophyseal stalk-transection of monkeys. Neuroendocrinology 32 : 14-18.

FUJIHARA N. and SHIINO M. (1980) : The participation of corticosterone in luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) action on luteinizing hormone (LH) release from anterior pituitary cells in vitro. Life Sci. 26 : 777-781.

GANONG W.F. - ALPERT L.C. and LEE T.C. (1974) : ACTH and the regulation of adrenocortical secretion. New Engl. J. Med. 290 : 1006-1011.

GARCIA-VELA A. and SOLANO A.R. (1980) : Endocrinology 106 A : 621.

GODING J.R. - CATT K.J. - BROWN J.M. - KALTENBACH C.C. - CUMMING I.A. and MOLE B.J. (1969) : Radioimmunoassay for ovine luteinizing hormone. Secretion of luteinizing hormone during estrus and following estrogen administration in the sheep. Endocrinology 85 : 133-142.

GOODMAN A.L. - NIXON W.E. - JOHNSON D.K. and HODGEN G.D. (1977) : Regulation of folliculogenesis in the cycling Rhesus monkey : selection of the dominant follicle. Endocrinology 100 : 155-161.

GOODMAN R.L. and KNOBIL E. (1981) : The sites of action of ovarian steroids in the regulation of LH secretion. Neuroendocrinology 32 : 57-63.

GOODMAN R.L. - PICKOVER S.M. and KARSCH F.J. (1981) : Ovarian feedback control of follicle stimulating hormone in the ewe : Evidence for selective suppression. Endocrinology 108 : 772-777.

GORDON J.H. and REICHLIN S. (1974) : Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing factor during the rat estrous cycle. Endocrinology 94 : 974-978.

GREELEY G.H. and KIZER J.S. (1979) : Evidence for adrenal involvement in the modulatory role of prolactin in luteinizing hormone secretion in the male rat. Endocrinology 104 : 948-953.

GREENWOOD F. - HUNTER W. and GLOBER S. (1963) : Preparation of 131I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89 : 114-121.

GUNAGA K.P. and MENON K.M.J. (1973) : Effect of catecholamines and ovarian hormones on cyclic AMP accumulation in rat hypothalamus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54 : 440-448.

HAGINO N. (1980) : A role of the rostral hypothalamus in the regulation of LH-RH release in baboons. Hormone Metab. Res. 12 : 150-154.

HALASZ B. and GORSKI R.A. (1967) : Gonadotrophic hormone secretion in the female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. Endocrinology 80 : 608-621.

HALASZ B. and PUPP L. (1965 a) : Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. Endocrinology 77 : 553-562.

HALASZ B. - PUPP L. and UHLARIK S. (1962) : Hypophysiotrophic area in the hypothalamus. J. Endocrinol. 25 : 147-154.

HALASZ B. - PUPP L. - UHLARIK S. and TIMA L. (1965 b) : Further studies on the hormone secretion of the anterior pituitary transplanted into the hypophysiotrophic area of the rat hypothalamus. Endocrinology 77 : 343-355.

HARRIS G.W. (1955) : Neural control of the pituitary gland. Monographs of the Physiological Society n° 3. Edward Arnold, London, 299 p.

HEIMER L. and LARSSON K. (1967) : Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. Brain Res. 3 : 248-263.

HELMOND F.A. - SIMONS P.A. and HEIN P.R. (1981) : Strength and duration characteristics of the facilitory and inhibitory effects of progesterone on the estrogen-induced gonadotropin surge in the female Rhesus monkey. Endocrinology 108 : 1837-1842.

HENDRICK J.C. (1972) : L'utilisation des immunoadsorbants en radio-immunologie. Thèse de Doctorat, Université de Liège, Faculté de Médecine, 141 p.

HENDRICK J.C. - LEGROS J.J. et FRANCHIMONT P. (1971) : Le dosage radio-immunologique de la FSH de rat et étude radio-immunologique de la réaction croisée entre la FSH de rat, de mouton et de porc. Ann. Endocrinol. 32 : 241-251.

HESS D.L. - WILKINS R.H. - MOOSSY J. - CHANG J.L. - PLANT T.M. - Mc CORMAK J.T. - NAKAI Y. and KNOBIL E. (1977) : Estrogen induced gonadotropin surges in decerebrated female Rhesus monkeys with medial-basal hypothalamic peninsulae. Endocrinology 101 : 1264-1277.

HIROSHIGE T. - SAKAKURA M. (1971) : Circadian rhythm of corticotropin releasing activity in the hypothalamus of normal and adrenalectomized rats. Neuroendocrinology 7 : 25-36.

HODGEN G.D. - WILKS J.W. - VAITUKAITIS J.L. - CHEN H.C. - PAPKOFF H. and ROSS G.T. (1976) : A new radioimmunoassay for follicle stimulating hormone in Macaques : Ovulatory menstrual cycles. Endocrinology 99 : 137-145.

HOFFMAN G.E. (1976) : Immunocytochemical localization of luteinizing-releasing hormone (LH-RH) in murine and primate brain. Anat. Rec. 184 : 429.

HOFFMAN G.E. - MELNYK V. - HAYES T. - BENNETT-CLARKE C. and FOWLER E. (1978) : Immunocytology of LH-RH neurons. In "Neural Hormones and Reproduction". D.E. SCOTT G.P. KOZLOWSKI and A. WEINDL eds. KARGER, Basel : 67-81.

HOKFELT T. - ELDE R. - FUXE K. - JOHANSSON O. - LJUNGDAHL A. - GOLDSTEIN M. - LUFT R. - EFENDIC S. - NILSSON G. - TERENIUS L. - GANTEN D. - JEFFLOATE S. - REHFELD J. - SAID S. - PEREZ DE LA MORA M. - POSSANI L. - TAPIA R. - TERAN L. and PALACIOS R. (1978) : Aminergic and peptidergic pathways in the neurons system with special reference to the hypothalamus. In "The Hypothalamus" (eds Reichlin S. and Baldessarini R.) Raven Press. New York : 69-135.

HOLZBAUER M. and GODDEN V. (1974) : Variations in the progesterone content of the rat adrenal gland during the oestrous cycle. J. Steroid Biochem. 5 : 109-111.

HOLZBAUER M. - NEWPORT H.M. - BIRMINGHAM M.K. and TRAIKOV H. (1969) : Secretion of Pregn-4-ene 3,20-dione (progesterone) in vivo by the adrenal gland of the rat. Nature (Lond.) 221 : 572-573.

HUMMEL B.C.W. - BROWN G.M. - WEBSTER B.R. and PAICE J.C. (1974) : Cross-Reactivity of monkey pituitary extracts in human radioimmunoassays. Gen. Comp. Endocrinol. 23 : 143-153.

HUTCHINSON T.C. (1970) : Vaginal cytology and reproduction in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). Folia Primatol. 12 : 212-223.

JACKSON G.L. - KUEHL D. - Mc DOWELL K. and ZALESKI A. (1978) : Effects of hypothalamic deafferentation on secretion of luteinizing hormone in the ewe. Biol. Reprod. 17 : 808-819.

JENNES L. and CROIX D. (1980) : Changes in the LH-RH immunoreactivity of hypothalamic structures during late pregnancy and after parturition in the guinea-pig. Cell. Tissue Res. 205 : 121-131.

JIRGENSONS B. (1960) : Optical rotatory dispersion of some pituitary hormones. Arch.Biochem. Biophys. 91 : 123-129.

JONES M.T. and HILLHOUSE E.W. (1977) : Neurotransmitter regulation of corticotrophin releasing factor"in vitro". Ann. N.Y. Acad. Sci. 297 : 536-560.

JOSHI H.S. - WATSON D.J. and LABHSETWAR A.P. (1973) : Ovarian secretion of oestradiol, oestrone, 20 dihydro-progesterone and progesterone during the oestrus cycle of the guinea-pig. J. Reprod. Fert. 35 : 177-181.

KALRA P.S. and KALRA S.P. (1977) : Temporal changes in the hypothalamic and serum luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) levels and the circulating ovarian steroids during the rat oestrous cycle. Acta Endocrinol. 85 : 449-455.

KAMBERI I.A. - MICAL R.S. and PORTER J.C. (1969) : LH releasing activity in the hypophysial stalk blood and elevation by dopamine. Science 166 : 388-390.

KAMBERI I.A. - MICAL R.S. and PORTER J.C. (1970) : Effects of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines and indoleamines ou LH release. Endocrinology 87 : 1-12.

KANEKO M. - KANEKO K. - SHINSAKO J. and DALLMAN M.F. (1981) : Adrenal sensitivity to adrenocorticotropin varies diurnally. Endocrinology 109 : 70-75.

KARSCH F.J. and SUTTON G.P. (1976) : An intra-ovarian site for the luteolytic action of estrogen in the Rhesus monkey. Endocrinology 98 : 553-561.

KARSCH F.J. - DIERSCHKE D.J. and KNOBIL E. (1973 b) : Sexual differentiation of pituitary function : apparent differences between primates and rodents. Science 179 : 484-486.

KARSCH F.J. - WEICK R.F. - BUTLER W.R. - DIERSCHKE D.J. - KREY L.C. - WEISS G. - HOTCHKISS J. - YAMAJI T. and KNOBIL E. (1973 a) : Induced LH surges in the Rhesus monkey : strengthduration characteristics of the estrogen-stimulus. Endocrinology 92 : 1740-1747.

KATO J. (1973) : Localization of oestradiol receptors in the rat hypothalamus. Acta Endocrinol. 72 : 663-670.

KATO J. and VILLEE C.A. (1967) : Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. Endocrinology 80 : 567-575.

KAWANO H. and DAIKOKU S. (1981) : Immunohistochemical demonstration of LH-RH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 32 : 173-186.

KEEFER D.A. and STUMPF W.E. (1975) : Atlas of estrogen concentrating cells in the central nervous system of the squirrel monkey. J. Comp. Neurol. 160 : 419-442.

KELLER N. - RICHARDSON U.I. and YATES F.E. (1969) : Protein binding and the biologic activity of corticosteroids : in vivo induction of hepatic and pancreatic alanine aminotransferase by corticosteroids in normal and estrogen treated rats. Endocrinology 84 : 49-62.

KERCRET H. - DUVAL J. (1975) : Etude par électrofocalisation des gonadotrophines hypophysaires du rat. Biochimie 57 : 85-90.

KERDELHUE B. - JUTISZ M. - GILLESSEN D. and STUDER R.O. (1973) : Obtention of antisera against a hypothalamic decapeptide (luteinizing hormone/follicle stimulating hormone releasing hormone) which stimulates the release of pituitary gonadotropins and development of its radioimmunoassay. Biochim. Biophys. Acta 297 : 540-548.

KESNER J.S. - CONVEY E.M. and ANDERSON C.R. (1981) : Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LH-RH and then increasing LH-RH release. Endocrinology 108 : 1386-1391.

KING R.J.B. and MAINWARING W.I.P. (1974) : "Steroid-Cell Interactions". University Park Press, Baltimore : 102-161.

KITAY J.I. (1961) : Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. Endocrinology 68 : 818-824.

KITAY J.I. (1963) : Pituitary adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement. Endocrinology 73 : 253-260.

KITTINGER G.W. and BEAMER N.B. (1968) : Quantitative gas chromatography of squirrel monkey (Saimiri Sciureus) corticosteroids. Steroids 11 : 275-289.

KNIGGE K.M. (1962) : Gonadotropic activity of neonatal pituitary glands implanted in the rat brain. Amer. J. Physiol. 202 : 387-391.

KNOBIL E. (1974) : On the control of gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. Rec. Progr. Hormone Res. 30 : 1-46.

KORDON C. and GLOWINSKI J. (1972) : Role of hypothalamic monoaminergic neurones in the gonadotrophin release-regulating mechanisms. Neuropharmacol. 11 : 153-162.

KOVES K. - MARTON J. - MOLNAR J. and HALASZ B. (1981) : ($D.Met^2$, Pro^5) - Enkephalinamide-Induced blockade of ovulation and its reversal by Naloxone in the rat. Neuroendocrinology 32 : 82-86.

KOYAMA T. - SAITO M. and HAGINO N. (1977) : Effects of anterior hypothalamic deafferentation on plasma LH response to LH-RH in the baboon. Folia Endocrinol. Jap. 53 : 921-928.

KREY L.C. and SILVERMAN A.J. (1978) : The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea-pig brain. II : The regulation on gonadotropin secretion and the origin of terminals in the median eminence. Brain Res. 157 : 247-255.

KREY L.C. - BUTTLER W.R. and KNOBIL E. (1975) : Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the Rhesus monkey. I. Gonadotropin secretion. Endocrinology 96 : 1073-1087.

KRIEGER D.T. (1979) : Rhythms in CRF, ACTH and corticosteroids in : "Endocrine rhythms" Krieger, ed. - Raven Press, New York : 124-142.

KRISCH B. (1978) : The distribution of LH-RH in the hypothalamus of the thirsting rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. Cell. Tissue Res. 186 : 135-148.

KUHL H. and TAUBERT H. (1975 a) : Inactivation of luteinizing hormone releasing hormone by rat hypothalamic L-cystine arylamidase. Acta Endocrinol. 78 : 634-648.

KUHL H. and TAUBERT H. (1975 b) : Short-loop feedback mechanism of luteinizing hormone : LH stimulates hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate LH-RH in the rat hypothalamus. Acta Endocrinol. 78 : 649-655.

KUTAS M. - CHUNG A. - BARTOS D. and CASTRO A. (1972) : A simple progesterone radioimmunoassay without column chromatography. Steroids 20, 6 : 697-716.

LAGACE L. - MASSICOTE J. - LABRIE F. (1980) : Acute stimulatory effects of progesterone on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. Endocrinology 106 : 684-689.

LASLEY B.L. - WANG C.F. and YEN S.S.C. (1975) : The effects of estrogen and progesterone on the functional capacity of the gonadotrophs. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41 : 820-826.

LAWTON I.E. (1972) : Facilitatory feedback effects of adrenal and ovarian hormones on LH secretion. Endocrinology 90 : 575-579.

LEGAN S.J. and KARSCH F.J. (1974) : Recent studies of hypothalamic function. Int. Symp. Calgary (1973) Karger Basel : 147-165.

LEONARDELLI J. (1961 a) : Recherches sur les mécanismes de contrôle hypothalamique de l'axe préhypophyso-ovarien chez le cobaye. Thèse de Doctorat en Médecine, Université d'Alger, n° 61.

LEONARDELLI J. (1961 b) : Modifications de la muqueuse vaginale du cobaye au cours du cycle oestral. C.R. Soc. Biol. 155 : 2313-2314.

LEONARDELLI J. (1962) : Formation et évolution des corps progestatifs chez le cobaye. Etude caryométrique. C.R. Soc. Biol. 156 : 58-60.

LEONARDELLI J. (1971) : Monoamines et fonction gonadotrope. ds fonction gonadotrope et rapports hypothalamo-hypophysaires chez les animaux sauvages. HERLANT M. éd. Masson Paris : 110-127.

LEONARDELLI J. (1977) : Modifications des neurones hypothalamiques à LH-RH après injection intraventriculaire de prolactine chez le cobaye. Ann. Endocrinol. (Paris) 38 : 235-242.

LEONARDELLI J. and CROIX D. (1977) : Serotonin and gonadoliberin (LH-RH) producing neurons. In : "Cell Biology of Hypothalamic Neurosecretion" VINCENT J.D., KORDON C. eds, Coll. Int. CNRS 280 : 173-178.

LEONARDELLI J. and POULAIN P. (1977) : About a ventral LH-RH preoptico-amygdaloid pathway in the guinea-pig. Brain Res. 124 : 538-543.

LEONARDELLI J. - BARRY J. et DUBOIS M.P. (1973 a) : Mise en évidence par immunofluorescence d'un constituant immunologiquement apparenté au LH-RF dans l'hypothalamus et l'éminence médiane chez les mammifères. C.R. Acad. Sci. (Paris) 276 : 2043-2046.

LEONARDELLI J. - CROIX D. - TRAMU G. et HERMAND E. (1977) : Prolactine et hormone ovulatoire du cobaye. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 17 : 477-482.

LEONARDELLI J. - DUBOIS M.P. and POULAIN P. (1974) : Effect of exogenous serotonin on LH-RH secreting neurons in the guinea-pig hypothalamus as revealed by immunofluorescence. Neuroendocrinology 15 : 69-72.

LEONARDELLI J. - HERMAND E. et TRAMU G. (1973 b) : Action du sulpiride sur les neurones hypothalamiques élaborateurs de LH-RH. C.R. Soc.Biol. 167 : 1815-1819.

LIBERTUN C. - ORIAS R. and Mc CANN S.M. (1974) : Biphasic effect of estrogen on the sensitivity of the pituitary to luteinizing hormone releasing factor (LRF). Endocrinology 94 : 1094-1100.

LINDNER H.R. - PEREL E. - FRIEDLAND A. and ZEITLIN A. (1972) : Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier. Steroids 19 : 357-375.

LORENZEN J.R. - SCHWARTZ N.B. and CHANNING C.P. (1978) : Preliminary characterization of folliculostatin-an FSH suppressing substance of ovarian follicular fluid. Biol. Reprod. 19 : 635-640.

LUMPKIN M. - NEGRO-VILAR A. - FRANCHIMONT P. and Mc CANN S.
Evidence for a hypothalamic site of action of inhibin to suppress FSH release. Endocrinology 108 : 1101-1104.

LU K.H. - CHEN H.T. - GRANDISON L. - HUANG H.H. and MEITES J. (1976) : Reduced luteinizing hormone release by synthetic luteinizing hormone - releasing hormone (LH-RH) in post partum lactating rats. Endocrinology 98 : 1235-1240.

MAKARA G.B. - STARK E. - RAPPAY G. - KARTESZI M. and PALKOVITS M. (1979) : Changes in corticotrophin releasing factor of the median eminence in rats with various cuts around the medial basal hypothalamus. J. Endocrinol. 83 : 165-173.

MANDL A.M. (1954) : The sensitivity of adrenalectomised rats to gonadotrophins. J. Endocrinol. 11 : 359-376.

MANIN M. and DELOST P. (1980) : Influence of dexamethasone on peripheral metabolic parameters of cortisol in the adult male conscious guinea-pig. J. Physiol. (Paris) 76 : 871-876.

MANN D.R. - KOROWITZ C.D. and BARRACLOUGH C.A. (1975) : Adrenal gland involvement in synchronizing the preovulatory release of LH in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150 : 115-120.

MATSUO H. - ARIMURA A. - NAIR R.M.G. and SCHALLY A.V. (1971 a) : Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid phase method. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 : 822-827.

MATSUO H. - BABA Y. - NAIR R.M.G. - ARIMURA A. and SCHALLY A.V. (1971 b) : Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 : 1334-1339.

MAZZUCA M. (1977) : Immunocytochemical and ultrastructural identification of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH)-containing neurons in the vascular organ of the lamina terminalis (OVLT) of the squirrel monkey. Neurosci. Lett. 5 : 123-127.

MAC CANN S.M. (1962) : A hypothalamic luteinizing hormone factor. Amer. J. Physiol. 202 : 395-400.

MAC CANN S.M. - TALEISNCK S. and FRIEDMAN H.M. (1960) : LH releasing activity in hypothalamic extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104 : 432-434.

MAC KENZIE J.M. (1968) : Humoral factors in the pathogenesis of Graves' disease. Physiol. Rev. 48 : 252-310.

MICHAEL R.P. - SETCHELL K.D.R. and PLANT T.M. (1974) : Diurnal changes in plasma testosterone and studies on plasma corticosteroids in nonanaesthetized male Rhesus monkeys (macaca mulatta). J. Endocrinol. 63 : 325-335.

MIDGLEY A.R. - NISWENDER G.D. and REBAR R.W. (1969) : Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). Acta Endocrinol. Supplt. 142 : 163-184.

MILLAR R.P. - AEHNELT C. and ROSSIER G. (1977) : Higher molecular weight immunoreactive species of luteinizing hormone releasing hormone : possible precursors of the hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 : 720-731.

MILLS I.H. - SCHEDL H.P. - CHEN P.S. and BARTTER F.C. (1960) : The effect of estrogen administration on the metabolism and protein binding of hydrocortisone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 20 : 515-528.

MINAGUCHI H. and MEITES J. (1967) : Effects of suckling on the hypothalamic LH releasing factor and prolactin inhibiting factor, and on pituitary LH and prolactin. Endocrinology 80 : 603-607.

MIYAKE A. - KAWAMURA Y. - AONO T. and KURACHI K. (1980) : Changes in plasma LRH during the normal menstrual cycle in women. Acta Endocrinol. 93 : 257-263.

MONAHAN M. - RIVIER J. - BURGUS R. - AMOSS M. - BLACKWELL R. - VALE W. et GUILLEMIN R. (1971) : Synthèse totale par phase solide d'un décapeptide qui stimule la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires LH et FSH. C.R. Acad. Sci. 273 : 508-510.

MOORE D.E. - KAWAGOE S. - DAVAJAN V. - MISHELL D.R. and NAKAMURA R.M. (1978 a) : An "in vivo" system in man for quantitation of estrogenicity. I. Physiologic changes in binding capacity of serum corticosteroid globulin. Amer. J. Obstet. Gynecol. 130 : 475-481.

MOORE D.E. - KAWAGOE S. - DAVAJAN V. - NAKAMURA R.M. and MISHELL D.R. (1978 b) : An "in vivo" system in man for quantitation of estrogenicity. II. Pharmacologic changes in binding capacity of serum corticosteroid - binding globulin induced by conjugated estrogens, mestranol and ethinyl estradiol. Amer. J. Obstet. Gynecol. 130 : 482-486.

MORRISON M. and BAYSE G.D. (1970) : Catalysis of iodonisation by lactoperoxidase. Biochemistry 9 : 2995-3000.

MOSS R.L. (1978) : In "Psychopharmacology : A generation of progress". (M.A. Lipson, ed) Raven New York : 431-440.

MOSS R.L. - Mc CANN S.M. and DUDLEY C.A. (1975) : Releasing hormones and sexual behavior. In : "Hormones homeostasis and the brain progress in brain research". W.H. Gispen ed, Amsterdam Elsevier (North Holland Biomedical Press) 42 : 37-46.

NAFTOLIN F. - BROWN-GRANT K. and CORKER C.S. (1972) : Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrous cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. J. Endocrinol. 53 : 17-30.

NAIK D.V. (1975) : Immuno-electron microscopic localization of luteinizing hormone releasing hormone in the arcuate nuclei and median eminence of the rat. Cell. Tissue Res. 157 : 437-455.

NAKAI Y. - PLANT T.M. - HESS D.L. - KEOGH E.J. and KNOBIL E. (1978) : On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. Endocrinology 102 : 1008-1014.

NEGRO-VILAR A. - ORIAS R. and Mc CANN S.M. (1973) : Evidence for a pituitary site of action for the acute inhibition of LH release by estrogen in the rat. Endocrinology 92 : 1680-1684.

NETT T.M. and ADAMS T.E. (1977) : Further studies on the radioimmunoassay of gonadotropin releasing hormone : Effect of radioiodination, antiserum and unextrated serum on levels of immunoreactivity in serum. Endocrinology 101 : 1135-1144.

NICHOLS D.J. and CHEVINS P.F.D. (1981) : Plasma corticosterone fluctuations during the oestrus cycle of the house mouse. Experientia 37 : 319-320.

NISWENDER G.D. - MIDGLEY A.R. - MONROE S.E. and REICHERT L.E. (1968 b) : Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH ^{131}I. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 : 807-811.

NISWENDER G.D. - MIDGLEY A.R. and REICHERT L.E. (1968 a) : Radioimmunologic studies with murine, bovine, ovine and porcine luteinizing hormone ; in "Gonadotropins". E. ROSEMBERE, ed. Geron X Inc. Publ. Los Altos Calif. 299-306.

NORDMANN J.J. (1976) : Evidence for calcium inactivation during hormone release in the rat neurohypophysis. J. Exp. Biol. 65 : 669.

NORMAN R.L. - BLAKE C.A. and SAYWER C.H. (1972) : Effects of hypothalamic deafferentation on LH secretion and the estrous cycle in the hamster. Endocrinology 91 : 95-100.

NORMAN R.L. - RESKO J.A. and SPIES H.G. (1976) : The anterior hypothalamus : how it affects gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. Endocrinology 99 : 59-71.

O'CONNOR R.F. and WOLF R.C. (1971) : Seasonal fluctuation in plasma progestins of the squirrel monkey. Amer. Zool. 11 : 649.

OGLE T.F. (1977) : Modification of serum luteinizing hormone and prolactin concentrations by corticotropin and adrenalectomy in ovariectomized rats. Endocrinology 101 : 494-497.

OLIVER C. - CONTE-DEVOLX B. - GIRAUD P. - GILLIOZ P. - LISSITZKY J.C. et BOUDOURESQUE F. (1980) : Contrôle hypothalamique de la sécrétion d'ACTH. Hormone Res. 13 : 230-241.

OSHIMA I. - MORISHITA H. - OMURA K. and SAITO S. (1978) : Changes in hypothalamic LH-RH content and blood levels of LH-RH, gonadotropin and estradiol during the preovulatory stage of rat estrous cycle. Endocrinol. Jpn. 25 : 607-611.

O'STEEN W.K. (1965) : Suppression of ovarian activity in immature rats by serotonin. Endocrinology 77 : 937-939.

OTTENWELLER J.E. - MEIER A.H. - RUSSO A.C. and FRENKE M.E. (1979) : Circadian rythms of plasma corticosterone binding activity in the rat and the mouse. Acta Endocrinol. 91 : 150-157.

PALKOVITS M. (1977) : Neural pathways involved in ACTH regulation. Ann. New York Acad. Sci. 297 : 455-476.

PALKOVITS M. - MEZEY E. - AMBACH G. and KIVOVICS P. (1978) : Neural and vascular connections between the organism vasculosum laminae terminalis and preoptic nuclei. Brain Endocrinol. Interact. Neural Horm. Reprod., Int. Symp. 3 rd 1977 : 302-312.

PAPKOFF H. (1966) : In "Glycoproteins" Ed. GOTTSCHALK, ELSEVIER, Amsterdam, New York, 532.

PAPKOFF H. - GOSPODAROWICZ D. and LI C.H. (1967) : Purification and properties of ovine follicle stimulating hormone. Arch. Biochem. Biophys. 120 : 434-439.

PARKES A.S. and DEANESLEY R. (1966) : Relation between the gonads and the adrenal glands. In PARKES Marshall's physiology of reproduction (Little Brown and Co, Boston) 1064-1111.

PARLOW A.F. (1961) : Bioassay of pituitary luteinizing hormone by depletion of ovarian ascorbic acid. In "Human Pituitary Gonadotropins" (A. Albert, ed.) C.C. THOMAS Springfield, Illinois, U.S.A., 300-310.

PASTEELS J.L. et ECTORS F. (1969) : Niveau et mode d'action des stéroïdes génitaux sur le contrôle des fonctions gonadotropes. Colloque CNRS. Neuroendocrinologie : 339-349.

PFAFF D.W. (1978) : Peptide and steroid hormones and the neural mechanisms for female reproductive behavior. In "The Hypothalamus" (S. REICHLIN, J.B. BALDESSARINI and J.B. MARTIN eds) Raven, New York : 245-253.

PFAFF D. and KEINER M. (1973) : Atlas of estradiol concentrating cells in the central nervous system of the female rat. J. Comp. Neurol. 151 : 121-157.

PFAFF D.W. - GERLACH J.L. - Mc EVEN B.S. - FERIN M. - CARMEL P. and ZIMMERMAN E.A. Autoradiographic localization of hormone-concentrating cells in the brain of the female Rhesus monkey. J. Comp. Neurol. 170 : 279-294.

PHILLIPS J.G. and POOLSANGUAN W. (1978) : A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexuel status in the female laboratory rat. J. Endocrinol. 77 : 283-291.

PIACSEK B.E. and HOFSTETTER M.W. (1977) : Patterns of pituitary and gonadal secretions during a twenty-four hour period in the male rat. Biol. Reprod. 16 : 495-498.

PIACSEK B.E. - SCHNEIDER T.C. and GAY V.L. (1971) : Sequential study of luteinizing hormone (LH) and "progestin" secretion on the afternoon of proestrus in the rat. Endocrinology 89 : 39-45.

PICARD G.E. and SILVERMAN A.J. (1976) : Neurosci. Abstr. (Soc. Neurosci.) 2 : 679.

PICKERING A.J.M.C. and FINK G. (1979) : Priming effect of luteinizing hormone releasing factor "in vitro": role of protein synthesis contractile elements Ca^{2+} and cyclic A.M.P. J. Endocrinol. 81 : 223-234.

PIERCE J.G. - BAHL O.P. - CORNWELL J.S. and SWAMINATHAN N. (1971 a) : 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. J. Biol. Chem. 246 : 2321-2324.

PIERCE J.G. - LIAO T.H. - CORNWELL J.S. and CARLSEN R.B. (1971 b) : Protein and polypeptide hormones 91.

PIPER E.L. - PERKINS J.L. - TUGWELL D.R. and VAUGHT W.G. (1975) : Inhibition of LH release as influenced by LRF infusion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148 : 880-882.

PLANT T.M. - KREY L.C. - MOOSSY J. - Mc CORMACK J.T. and KNOBIL E. (1978) : The arcuate nucleus and the control of gonadotropin and prolactin secretion in the Rhesus monkey (macaca mulatta). Endocrinology 102 : 52-62.

PORTER J.C. - MICAL R.S. and CRAMER O.M. (1971/72) : Effect of serotonin and other indoles on the release of LH, FSH and prolactin. Gynecol. Invest. 2 : 13-22.

PORTER J.C. - MICAL R.S. - TIPPIT P.R. - WANZER DRANE J. (1970) : Effect of selective surgical interruption of the anterior pituitary's blood supply on ACTH release. Endocrinology 86 : 590-599.

POULAIN P. (1968) : Modifications de l'appareil génital du cobaye femelle après lésions stéréotaxiques de l'hypothalamus antérieur. C.R. Soc. Biol. 162 : 1943-1945.

RAMALEY J.A. (1973) : Role of the adrenalin PMS-induced ovulation before puberty : effect of adrenalectomy. Endocrinology 92 : 881-887.

RAMALEY J.A. (1975) : Differences in serum corticosterone patterns in individual rats. Relationship to ovulatory cycles. J. Endocrinol. 66 : 421-426.

RAMALEY J.A. and BARTOSIK D. (1975) : Precocious puberty : the effect of adrenalectomy on PMS induced ovulation and progesterone secretion. Endocrinology 96 : 269-274.

RANCE N. - WISE P.M. - SELMANOFF M.K. and BARRACLOUGH C.A. (1981) : Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone - releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrious day 1. Endocrinology 108 : 1795-1802.

RAPS D. - BARTHE P.L. and DE SAULLES P.A. (1971) : Plasma and adrenal corticosterone levels during the different phases of the sexual cycle in the female rat. Experientia 27 : 339-340.

REICHERT L.E. (1971) : Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing. Endocrinology 88 : 1029-1044.

REICHERT L.E. and MIDGLEY A.R. (1968) : Preparation of purified rat follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 : 1001-1004.

RENAUD L.P. - MARTIN J.B. and BRAZEAU P. (1976) : Hypothalamic releasing factors : Physiological evidence for a regulatory action on central neurons and pathways for their distribution in brain. Pharmacol. Biochem. Behav. 5 : 171-178.

RICHARD P. - FREUND-MERCIER M.J. et MOOS F. (1978) : Les neurones hypothalamiques ayant une fonction endocrine. J. Physiol. (Paris) 74 : 61-112.

ROOD J.P. (1972) : Ecological and behavioral comparison of three genesa of Argentine cavies. In : "Animal Behavior Monographs", Cullen J.M. and Beer C.G. (eds), Baillière Tindall London 5 : 3-83.

ROSENBLUM L.A. (1968) : Some aspects of female reproductive physiology in the squirrel monkey. In : "The Squirrel Monkey" (L.A. ROSENBLUM and R.W. COOPER eds), Acad. Press New York : 147-169.

ROSNER W. (1972) : Recent studies on the binding of cortisol in serum. J. Steroid Biochem. 3 : 63-88.

RUDER H.I. - GUY P.L. and LIPSETT M.B. (1972) : Radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. J. Clin. Endocrinol. 35 : 219.

RYAN R.J. - JIANG N.S. and HANLON S. (1970) : Some physical and hydrodynamic properties of human FSH and LH. Recent Prog. Hormone Res. 26 : 105-137. Ed. E.B. Astwood. Acad. Press. New York.

RYSZKA F.J. - KOGAN G.A. and STRUCHKOVA M.J. (1971) : Molekularnaya Biologia 5 : 487.

SACHS H. - FAWCETT P. - TAKABATAKE Y. and PORTANOVA R. (1969) : Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin. Recent Prog. Hormone Res. 25 : 447.

SAMSON W.K. and Mc CANN S.M. (1979 a) : Effects of lesions in the organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) on the hypothalamic distribution of LH-RH and gonadotropin secretion in the ovariectomized female rat. Endocrinology 105 : 939-946.

SAMSON W.K. and Mc CANN S.M. (1979 b) : Effects of suprachiasmatic nucleus lesions on hypothalamic LH-releasing hormone (LH-RH) content and gonadotropin secretion in the ovariectomized (ovx) female rat. Brain Res. Bull. 4 : 783-788.

SARKAR D.K. and FINK G. (1979) : Effects of gonadal steroids on output of luteinizing hormone releasing factor into pituitary stalk blood in the female rat. J. Endocrinol. 80 : 303-313.

SARKAR D.K. and FINK G. (1981) : Gonadotropin releasing hormone surge : possible modulation through postsynaptic α-adrenoreceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. Endocrinology 108 : 862-867.

SARKAR D.K. - CHIAPPA S.A. - FINK G. and SHERWOOD N.M. (1976) : Gonadotropin releasing hormone surge in proestrus rats. Nature 264 : 461-463.

SAWYER C.H. (1952) : Stimulation of ovulation in the rabbit by the intraventricular injection of epinephrine or norepinephrine. Anat. Record. 112 : 385.

SAWYER C.H. - MARKEE J.E. and HOLINSHEAD W.H. (1947) : Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. Endocrinology 41 : 395-402.

SCHALLY A.V. (1978) : Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Science 202 : 18-28.

SCHALLY A.V. - ARIMURA A. - BABA Y. - NAIR R.M.G. - MATSUO H. - REDDING T.W. - DEBELJUK L. and WHITE W.F. (1971 a) : Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 : 393-399.

SCHALLY A.V. - ARIMURA A. - KASTIN A.J. - BABA Y. - REDDING T.W. - NAIR R.M.G. and DEBELJUK L. (1971 b) : Gonadotropin releasing hormones ; one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormone. Science 173 : 1036-1037.

SCHALLY A.V. - REDDING T.W. and ARIMURA A. (1973) : Effect of sex steroids on pituitary responses to LH and FSH-releasing hormone "in vitro". Endocrinology 93 : 893-902.

SCHUILING G.A. and GNODDE H.P. (1976) : Secretion of luteinizing hormone caused by continuous infusions of luteinizing hormone releasing hormone in the long-term ovariectomized rat : effect of oestrogen pretreatment. J. Endocrinol. 71 : 1-11.

SCHUILING G.A. and GNODDE H.P. (1977) : Oestrogen induced changes in the secretion of luteinizing hormone releasing hormone in the long-term ovariectomized rat. J. Endocrinol. 72 : 121-126.

SCHWANZEL-FUKUDA M. and SILVERMAN A.J. (1978) : The distribution of LH-RH in the fetal guinea pig brain. Soc.Neurosci. Abst. november.

SCHWARTZ N.B. (1964) : Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight and vaginal cornification. Amer. J. Physiol. 207 : 1251-1259.

SEAL U.S. and DOE R.P. (1965) : Vertebrate distribution of corticosteroid binding globulin and some endocrine effects on concentration. Steroids 8 : 827-841.

SEAL U.S. and DOE R.P. (1966) : Steroid dynamics. Acac. Press New York : 63-88.

SETALO G. - FLERKO B. - VIGH S. - ARIMURA A. and SCHALLY A.V. (1978) : In "Neurosecretion - Neurosecretion and neuroendocrine activity". (W. BARGMANN, A. OKSCHE and A. POLENOV, eds) Springer Verlag, Berlin and New York : 287-289.

SETALO G. - VIGH S. - SCHALLY A.V. - ARIMURA A. and FLERKO B. (1976) : Immunohistological study of the origin of LH-RH containing nerve fibers of the rat hypothalamus. Brain Res. 103 : 597-602.

SETCHELL B.P. and SIRINATHSINGHJI D.J. (1972) : Antigonadotrophic activity in rete testis fluid, a possible "inhibin". J. Endocrinol. 53 : LX-LXI.

SHAW R.W. - BUTT W.R. and LONDON D.R. (1975) : The effects of progesterone on FSH and LH response to LH-RH in normal women. Clin. Endocrinol. (Oxf.) 4 : 543-550.

SHERWOOD N.M. - CHIAPPA S.A. - SARKARD D.K. and FINK G. (1980) : Gonadotropin-releasing hormone (GN-RH) in pituitary stalk blood from proestrus rats : Effects of anesthetics and relationship between stored and released GN-RH and luteinizing hormone. Endocrinology 107 : 1410-1417.

SHERWOOD O.D. - GRIMEK H.J. and Mc SHAN W.H. (1970) : Purification and properties of follicle stimulating hormone from sheep pituitary glands. J. Biol. Chem. 245 : 2328-2336.

SIEVERTSSON H. - CHANG J.K. - CURRIE B.L. - BOGENTOFT C. - FOLKERS K. and BOWERS C.Y. (1971) : 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. 30 : 1193-1195.

SILVERMAN A.J. (1976) : Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in the guinea pig brain. Endocrinology 99 : 30-41.

SILVERMAN A.J. and KREY L.C. (1978) : The luteinizing hormone-releasing hormone neuronal networks in the guinea pig brain. I. Intra- and extra-hypotalamic projections. Brain Res. 157 : 233-246.

SILVERMAN A.J. and ZIMMERMAN E.A. (1978) : Pathways containing luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in the mammalian brain. In : "Brain-Endocrine Interaction. III. Neural Hormone and Reproduction" (D.E.Scott, G.P. Kozlowski and A. Weindl, eds) Karger, Basel : 83-96.

SILVERMAN A.J. - ANTUNES J.L. - FERIN M. and ZIMMERMAN E.A. (1977) : The distribution of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in the hypothalamus of the Rhesus monkey : light microscopic study using immunoperoxidase technique. Endocrinology 101 : 134-142.

SMITH M.S. (1978) : A comparison of pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone during lactation and the estrous cycle of the rat. Endocrinology 102 : 114-120.

SOLANO A.R. - VELA A.G. - KATT K.J. and DUFAU M.L. (1980) : Regulation of ovarian gonadotropin receptors and LH bioactivity during the estrus cycle. Febs Lett. 122 : 184-188.

SPIES H.G. - NORMAN R.L. - QUADRI K. and CLIFTON D.K. (1977) : Effect of estradiol-17 β on the induction of gonadotrophin release by electrical stimulation of the hypothalamus in Rhesus monkey. Endocrinology 100 : 314-324.

STEELMAN S.L. and POHLEY F.M. (1953) : Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. Endocrinology 53 : 604-616.

STEELMAN S.L. - SEGALOFF A. and MAYS M.C. (1958) : Arch. Biochem. Biophys. 78 : 262.

STOCKELL-HARTREE A. (1966) : A separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. Biochem. J. 100 : 754-761.

STOCKELL-HARTREE A. (1972) : Human pituitary luteinizing hormone. Colloque INSERM. Hormones glycoprotéiques hypophysaires : 71-82.

STROUPE S.D. - GRAY R.D. and WESTPHAL V. (1978) : Steroid-protein interactions; kinetics of binding of cortisol and progesterone to human corticosterbinding globulin Febs Lett. 86 : 61-64.

STUMPF W.E. (1968) : Estradiol concentrating neurons. Topography in the hypothalamus by dry-mount autoradiography. Science 162 : 1001-1003.

STUMPF W.E. (1971) : Hypophysiotropic neurons in the periventricular brain : topography of estradiol concentrating neurons ; in SAWYER and GORSKI Steroïd hormones and brain function, 215-227 (Univ. Calif. Press, Los Angeles).

SZENTAGOTHAI J. (1964) : Lectures in diencephalon the parvicellular neurosecretory system. In : "Progress in Brain Res." (W. Bargmann, Y.P. Schadé, eds) Amsterdam-London-New York Elsevier Publ. Co : 5 : 135-146.

TERASAWA E. and WIEGAND S.G. (1978) : Effects of hypothalamic deafferentation on ovulation and estrous cyclicity in the female guinea pig. Neuroendocrinology 26 : 229-237.

THORN N.A. (1970) : Mechanism of release of neurohypophysial hormones. In : "Aspects of Neuroendocrinology". Bargmann W., Scharrer B., eds, Springer, Berlin : 140.

TRAMU G. and LEONARDELLI J. (1979) : Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. Brain Res. 168 : 457-471.

TRAMU G. - BEAUVILLAIN J.C. - CROIX D. and LEONARDELLI J. (1981) : Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. Brain Res. 215 : 235-255.

TRAMU G. - LEONARDELLI J. and DUBOIS M.P. (1977) : Immunohistochemical evidence for an ACTH-like substance in hypothalamic LH-RH neurons. Neurosci. Lett. 6 : 305-309.

TRAVIS J.C. and HOLMES W.N. (1974) : Some physiological and behavioural changes associated with oestrus and pregnancy in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). J. Zool. (Lond.) 174 : 41-66.

TSOU R.C. - DAILEY R.A. - Mc LANAHAN C.S. - PARENT A.D. - TINDALL G.T. and NEILL J.D. (1977) : Luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) levels in pituitary stalk plasma during the preovulatory gonadotropin surge of rabbits. Endocrinology 101 : 534-538.

TURGEON J.L. and BARRACLOUGH C.A. (1973) : Temporal patterns of LH release following graded preoptic electrochemical stimulation in proestrous rats. Endocrinology 92 : 755-761.

TURGEON J.L. and BARRACLOUGH C.A. (1976) : The existence of a possible short-loop negative feedback action of LH in proestrous rats. Endocrinology 98 : 639-644.

TURGEON J.L. and BARRACLOUGH C.A. (1977) : Regulatory role of estradiol in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone on proestrus in the rat. Endocrinology 101 : 548-554.

VAGUE P. - OLIVER C. - JAQUET P. et VAGUE J. (1971) : Le dosage radio-immunologique de l'ACTH plasmatique. Résultats chez les sujets normaux. Rev. Europ. Clin. Biol. XVI : 485-493.

VALE W. - SPIESS J. - RIVIER C. and RIVIER J. (1981) : Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β-endorphin. Science 213 : 1394-1397.

VAN LOON G.R. (1973) : Brain catecholamines and ACTH secretion. In : "Frontiers in Neuroendocrinology" GANONG W.F. and MARTINI L. (eds). Oxford University PressNew York : 209-247.

VECSEI P. - PENKE B. - KATZY R. and BAEK L. (1972) : Radioimmunological determination of plasma cortisol. Experientia 8 : 1104.

VINSON G.P. - BELL J.B.G. and WHITEHOUSE B.J. (1976) : Production of testosterone and corticosteroids by the rat adrenal gland incubated"in vitro"and the effects of stimulation with ACTH, LH and FSH. J. Steroid Biochem 7 : 407-411.

WAREMBOURG M. (1970) : Fixation de l'oestradiol 3 H au niveau des noyaux amygdaliens, septaux et du système hypothalamo-hypophysaire chez la souris femelle. C.R. Acad. Sci. 270 : 152-154.

WAREMBOURG M. (1977) : Topographical distribution of estrogen concentrating cells in the brain and pituitary of the squirrel monkey. Neurosci. Lett. 5 : 315-319.

WEBB R. - ENGLAND B.G. and FITZPATRICK K.E. (1981) : Control of the preovulatory gonadotropin surge in the ewe. Endocrinology 108 : 1178-1185.

WEINDL A. and SOFRONIEW M.V. (1978) : Neurohormones and circumventricular organs. An immunohistochemical investigation. Brain Endocrinol. Interact.,Neural Horm. Reprod.,Int. Symp. 3 rd 1977 : 117-137.

WEISSMAN B.A. and SKOLNICK P. (1975) : Stimulation of Adenosine 3', 5'- Monophosphate Formation in incubated rat hypothalamus by estrogenic compounds : Relationship to biologic potency and blockade by anti-estrogens. Neuroendocrinology 18 : 27-34.

WENGER T. and LEONARDELLI J. (1980) : Circadian and cyclic LH-RH variations in the organum vasculosum of the lamina terminalis of female and male rats. Neuroendocrinology 31 : 331-337.

WESTPHAL V. (1975) : Binding of corticosteroids by plasma proteins. In : "Handbook of physiology" Sect. 7, Vol. VI, Amer. Physiol. Soc. : 118-123.

WIDE L. (1969) : Radioimmunoassays employing immunosorbants. Acta Endocrinol. (Copenh.) Supplt 142 : 207.

WILDT L. - HAUSLER A. - HUTCHISON J.S. - MARSHALL G. and KNOBIL E. (1981) : Estradiol as a gonadotropin releasing hormone in the Rhesus monkey. Endocrinology 108 : 2011-2013.

WILSON M.I. (1977) : Characterization of the oestrous cycle and mating season of squirrel monkeys from copulatory behaviour. J. Reprod. Fertil. 51 : 57-63.

WILSON M.I. - BROWN G.M. and WILSON D. (1978) : Annual and diurnal changes in plasma androgen and cortisol in adult male squirrel monkeys (Saimiri sciureus) studied longitudinally. Acta Endocrinol. 87 : 424-433.

WINTERS S.J. and LORIAUX D.L. (1978) : Suppression of plasma luteinizing hormone by prolactin in the male rat. Endocrinology 120 : 864-868.

YAMAMOTO S. - UTSU S. - TANIOKA Y. and OHSAWA N. (1977) : Extremely high levels of corticosteroids and low levels of corticosteroid binding molecule in plasma of marmoset monkeys. Acta Endocrinol. (Copenh.) 85 : 398-405.

YASUDA M. - GREER M.A. (1976) : Distribution of corticotropin releasing factor(s) activity in neural and extraneural tissue of the rat. Endocrinology 99 : 944-948.

YEN S.S.C. - LLERENA O. - LITTLE B. and PEARSON O.B. (1968) : Desappearance rates of endogenous luteinizing hormone and chorionic gonadotropin in man. J. Clin. Endocrinol. 28 : 1763.

YING S.Y. - LING N. - BOHLEN P. and GUILLEMIN R. (1981) : Gonadocrinins : Peptides in ovarian follicular fluid stimulating the secretion of pituitary gonadotropins. Endocrinology 108 : 1206-1215.

YUSSMAN M.A. - TAYMOR M.I. - MIYATA J. and PHETEPLACE C. (1970) : Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and plasma progestins correlated with human ovulation. Fertil. Steril. 21 (2) : 119-125.

ZIMMERMAN E.A. and LOBO-ANTUNES J. (1976) : Organization of the hypothalamic pituitary system ; current concepts from immunohistochemical studies. J. Histochem. Cytochem. 24 : 807-815.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE Section de SCIENCES LILLE