

50376
1991
76

65 897

50376
1991
76

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Année Universitaire 1990-1991

N° d'ordre 716

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

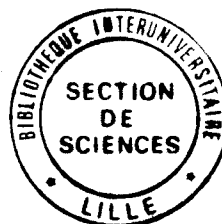
DOCTEUR

DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Mention : Biologie Cellulaire

par

Agnès DAUDIGNON



**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES SUBSTANCES
IMMUNOLOGIQUEMENT APPARENTÉES AU LH-RH DANS
L'OVAIRE DE QUELQUES MAMMIFÈRES : IMPLICATION
DANS LA FOLLICULOLOGÈNE**

Soutenu le 19 Avril 1991, devant la Commission d'Examen

JURY

Président : Monsieur A. DHAINAUT
Directeur de Thèse : Monsieur J. LEONARDELLI
Rapporteurs : Monsieur A. DHAINAUT
Monsieur G. TRAMU
Examineurs : Madame N. DHAINAUT
Madame P. SAINT-POL

A ma mère

A mon père

A Ahmed

A mes soeurs

A toute ma famille et mes amis

J'exprime tous mes remerciements,

à Mr le Professeur J. LEONARDELLI,
qui m'a accueillie dans son laboratoire et prodigué,
aide, conseils et soutien au cours de ces années de
préparation de thèse.

à Mr le Professeur A. DHAINAUT,
qui après m'avoir dispensé des enseignements de qualité
au cours de mes études, me fait l'honneur d'être rapporteur
de mon travail et de présider ce jury.

à Mr le Professeur G. TRAMU,
qui a accepté d'être rapporteur de mon travail. Qu'il
soit assuré de mon admiration et de toute ma gratitude.

à Mme le Professeur N. DHAINAUT,
qui a accepté de prendre sur son temps pour examiner ce
travail. Qu'elle en soit vivement remerciée.

à Mme le Docteur P. SAINT POL,
qui a, au jour le jour, suivi mon travail, et su me
communiquer son enthousiasme. Qu'elle soit assurée de toute
ma reconnaissance et de ma sincère amitié.

à Mr le Professeur HERMAND,
qui m'a conseillée dans ce travail avec beaucoup de
bienveillance. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

à Mlle A. LE CLAIRE,
pour sa compétence et sa patience dans la mise en page
du texte.

à Mr A. VANDERHAEGEN,
pour son aide efficace lors de la réalisation des
tirages photographiques.

Au Personnel d'Histologie, Embryologie et Biologie de la
Reproduction, qui a facilité mon intégration dans le
Laboratoire.

A tous les Membres du Service de Cytogénétique qui, par leur
sympathie et leur soutien, m'ont constamment encouragée dans
la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	1
FOLLICULOGENESE CHEZ LES MAMMIFERES	5
I. ANATOMIE FONCTIONNELLE DE L'OVAIRE	5
II. CROISSANCE FOLLICULAIRE	8
1°/ Conditionnement hormonal de la folliculogénèse	8
2°/ Sélection du follicule dominant	9
3°/ Maturation folliculaire	11
III. VAGUE DE CROISSANCE ET D'ATRESIE FOLLICULAIRE .	12
LH-RH OVARIEN	16
MATERIEL ET METHODES	20
I. OBTENTION DES IMMUNSERUMS	21
A. ORIGINE DE L'ANTIGENE	21
B. PROTOCOLE D'IMMUNISATION	21
1°/ Choix de la protéine porteuse	23
2°/ Couplage du peptide synthétique à la KLH par le glutaraldéhyde	23
a. matériel	23
b. protocole	24
3°/ Protocole d'immunisation	25
C. VERIFICATION DE LA PRODUCTION D'Ac PAR DOT-IMMUNOBINDING	27
1°/ Matériel	27
2°/ Procédé	27
D. PURIFICATION DES ANTICORPS	29
1°/ Précipitation des protéines par les sels .	29
2°/ Préparation des IgG de lapins sur protéine A sépharose	30
a. matériel	31
b. tampon et solutions	31
c. méthode	31
II. METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES	32
A. PREPARATION DES TISSUS	32
1°/ Fixation	32
2°/ Inclusion en paraffine	33
3°/ Coupe et montage sur lame	33
B. REACTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE	33
1°/ Déparaffinage des lames, par passages successifs dans les bains de :	34
2°/ Application du sérum spécifique	34
3°/ Application du sérum marqué	34
4°/ Révélation de la peroxydase	34
a. Utilisation de la diaminobenzidine	35
b. Utilisation du chloronaphtol	35

III. IMMUNOENZYMOLOGIE	36
A. DEFINITION	36
B. PARAMETRES DE LA REACTION	37
1°/ Adsorption de l'antigène	37
2°/ Conditions de saturation	39
3°/ Protocole	40
a. matériel	40
b. tampons et solutions	40
c. protocole	40
IV. EXTRACTION DU LH-RH	42
A. EXTRACTION PAR ULTRACENTRIFUGATION	42
1°/ Matériel	42
2°/ Protocole	42
B. EXTRACTION DE MILIEU ORGANIQUE	42
1°/ Solutions	43
2°/ Protocole	43
V. CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DE GEL FILTRATION .	43
1°/ Matériel	43
2°/ Phase mobile	43
3°/ Procédé	44
4°/ Chromatographie des échantillons	44
VI. WESTERN BLOT	45
1°/ Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE)	45
a. matériel	45
b. protocole	46
2°/ Transfert sur nitrocellulose par électro- élution	47
a. matériel	47
b. protocole	47
3°/ Détection immunologique	48
VII. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY EN POLARITE DE PHASE INVERSE C 18	48
1°/ Matériel	48
2°/ Solvants	48
3°/ Procédé	48

PREMIERE PARTIE

MISE AU POINT DU DOSAGE E.L.I.S.A. COMPETITIF DU LH-RH

I. DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ANTIGENE OPTIMALE A FIXER	50
II. DETERMINATION DE LA DILUTION OPTIMALE DE L'ANTICORPS	53
1°/ Détermination des meilleures saignées	53
2°/ Titre en anticorps des saignées	53
III. METHODE	58
IV. VALIDATION ET CONTROLE DES RESULTATS	59
1°/ Etablissement des courbes de référence	59
a. expression des résultats	59
b. détermination de la "zone de dosage"	60

2°/ Contrôle des résultats	63
a. références positives et négatives	63
b. spécificité du dosage	64
c. précision	71
d. sensibilité	71
e. reproductibilité	72
f. exactitude de la méthode	72

DEUXIEME PARTIE

ESSAI DE CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES SUBSTANCES LH-RH LIKE OVARIENNES CHEZ LE HAMSTER HYPERSTIMULE

INTRODUCTION	78
RESULTATS	83
I. ANIMAUX	83
II. RESULTATS EXTRACTION ET DOSAGES	84
DISCUSSION	95

TROISIEME PARTIE

ETUDE ONTOGENIQUE DES SUBSTANCES LH-RH LIKE OVARIENNES CHEZ LE RAT

INTRODUCTION	100
RESULTATS	104
I. DOSAGE E.L.I.S.A. DU LH-RH SUR EXTRAITS OVARIENS DE RAT	104
1°/ Période infantile	106
2°/ Période juvénile et adulte	106
II. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	108
1°/ Immunoréactivité cytoplasmique des ovocytes	108
2°/ Immunoréactivité des cellules de la granulosa	109
3°/ Immunoréactivité de la lignée théco- interstitielle	110
4°/ Immunoréactivité après culture	111
5°/ Marquage des axones des neurones à LH-RH dans l'éminence médiane de cerveau de cobaye	112
6°/ Marquage immunohistochimique des ovaires de hamsters et de chat	113

DISCUSSION	114
I. CROISSANCE FOLLICULAIRE PRECOCE ET LH-RH LIKE OVARIEN	114
II. DISCUSSION SUR LA LOCALISATION CELLULAIRE DE L'ir LH-RH	123
1°/ Marquage immunohistochimique des cellules de la granulosa	123
2°/ Marquage immunohistochimique des ovocytes des follicules préantraux	127
3°/ LH-RH et tissu interstitiel	131
 CONCLUSION GENERALE	 133
 PLANCHES	 1 à 11
 BIBLIOGRAPHIE	 I à XII

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

Ac	anticorps
ACN	acetonitrile
ADNc	ADN complémentaire
Ag	antigène
AMPc	adenosine monophosphate cyclique
AND	androgènes
BSA	serum albumine bovine
DAB	diaminobenzidine
DG	diacylglycerol
DHEA	dihydroepiandrostenedione
E.L.I.S.A.	enzyme linked immunosorbent assay
F.I.V.E.T.	fécondation in vitro et transfert d'embryons
FSH	folliculo stimulating hormone
GAP	GnRH associated peptide
GnRH	gonadotrophin releasing hormone
hCG	human chorionic gonadotrophin
hMG	human menopausal gonadotrophin
Icc	immunocytochimie
Ig	immunoglobuline
IGF	insulin like growth factor
IP3	inositol tri-phosphate
ir	immunoreactivite
KLH	Keyhole Limpet hemocyanin
LH	Luteinizing hormone
OEST	oestrogènes
PBS	phosphate saline buffer
PMA	procréation médicalement assistée
PMSF	phenylmethyl sulfonyl fluoride
RP-HPLC	reverse phase high performance liquid chromatography
RRA	radio-receptor assay
TBS	tris saline buffer
TFA	acide trifluoro acétique

AVANT-PROPOS

Depuis les années 1970, de nombreux travaux ont permis d'établir que l'ovaire est soumis à un double contrôle hormonal.

Le premier résultat de l'action des hormones gonadotropes l'hormone lutéinisante (luteinizing hormone, LH) et l'hormone folliculotrope (folliculo-stimulating-hormone, FSH). Ces deux hormones sont élaborées dans l'hypophyse sous contrôle hypothalamique et excrétées dans la circulation générale. Elles atteignent leur tissu cible, l'ovaire, où elles vont contrôler la croissance folliculaire et l'ovulation. Sous leur action stimulante, l'ovaire synthétise les hormones stéroïdes constituées de trois grands groupes, les androgènes, les oestrogènes et les progestagènes. Ces hormones participent localement au contrôle de la folliculogénèse, elles interviennent dans le développement des caractères sexuels secondaires, et enfin, elles ont un rôle rétroactif sur l'activité hypothalamo-hypophysaire.

Cependant, il est difficile d'expliquer les régulations fines du processus reproductif par la seule commande hypothalamo-hypophysaire. Des études chez le rat ont montré que la croissance folliculaire précoce est indépendante des hormones gonadotropes (Nakano et coll. 1975).

On observe également des follicules évolutifs jusqu'au stade antral dans les ovaires d'enfants et d'animaux impubères en absence de stimulation hypophysaire cyclique.

D'autres événements, tels que l'initiation de la méiose dans l'ovaire foetal, le recrutement constant des follicules primordiaux, les vagues de croissance et d'atrésie folliculaires ainsi que l'inhibition de la maturation ovocytaire ne peuvent être attribués à la seule variation du taux d'hormones gonadotropes.

L'hypothèse d'une régulation hormonale supplémentaire, s'est imposée avec la découverte de l'action de nombreuses substances sur la physiologie ovarienne. (Tableau n° 1)

Des facteurs intra ovariens, autres que les gonadotrophines et les stéroïdes, ont un rôle régulateur direct sur la croissance folliculaire, sur la différenciation cellulaire et sur la stéroïdogénèse.

Le concept d'une régulation paracrine et/ou autocrine de l'ovaire permet d'appréhender les multiples régulations physiologiques de la folliculogénèse.

Ces facteurs paracrines et/ou autocrines se fixent sur des récepteurs membranaires et induisent une réponse cellulaire par l'intermédiaire de deuxièmes messagers (AMPc, DG et IP₃, Ca²⁺).

Ces substances ont une action locale et elles sont produites en quantité infimes.

Elles agissent le plus souvent en synergie avec d'autres hormones, telles que les gonadotrophines et les stéroïdes et assurent un rôle modulateur. La plupart des facteurs paracrines sont très instables et par conséquent soumis à une dégradation rapide. Leur action peut, de ce fait, varier

TABLEAU 1. POSSIBLES REGULATEURS PARACRINE/AUTOCRINE DE LA
FONCTION OVARIENNE

- | | |
|---|----------------------------------|
| - Adénosine | - Luteinization inhibitor (LI)* |
| - Angiogenic factors | or atretogenic factor |
| - Catécholamines | - Luteinization stimulator (LS)* |
| - Epidermal growth factor
(EGF) | or maturation stimulator |
| - Fibroblast growth
factor (FGF) | - Oocyte maturation inhibitor * |
| | (OMI) |
| | - Ovarian growth stimulator(s) |
| | - Ocytosine |
| - Eicosanoides | - Platelet-derived growth factor |
| - Follicular regulatory
protein (s)* (FRP) | (PDGF) |
| - FSH-binding inhibitor | - Proopiomelanocortin-derived |
| FSH-BI * | hormones |
| - GABA acide amino | - Relaxine |
| butyrique | - Steroïdes |
| - GnRH-like peptide (s) * | - Substance P |
| - Insulin-like growth factors
(IGFs) | - Vasoactive intestinal peptide |
| | (VIP) |
| - LH-binding inhibitor | - vasopressine |
| (LH-BI) * | |

* en cours de caractérisation

substantiellement en fonction de l'état physiologique de la gonade.

Contrairement aux hormones endocrines classiques, qui peuvent être considérées comme des "macro-régulateurs", les facteurs autocrines et/ou paracrines semblent être impliquées dans des micro-régulations de la fonction ovarienne.

FOLLICULOGENESE CHEZ LES MAMMIFERES

I. ANATOMIE FONCTIONNELLE DE L'OVAIRE

Le follicule : unité fonctionnelle (Schéma n° 1)

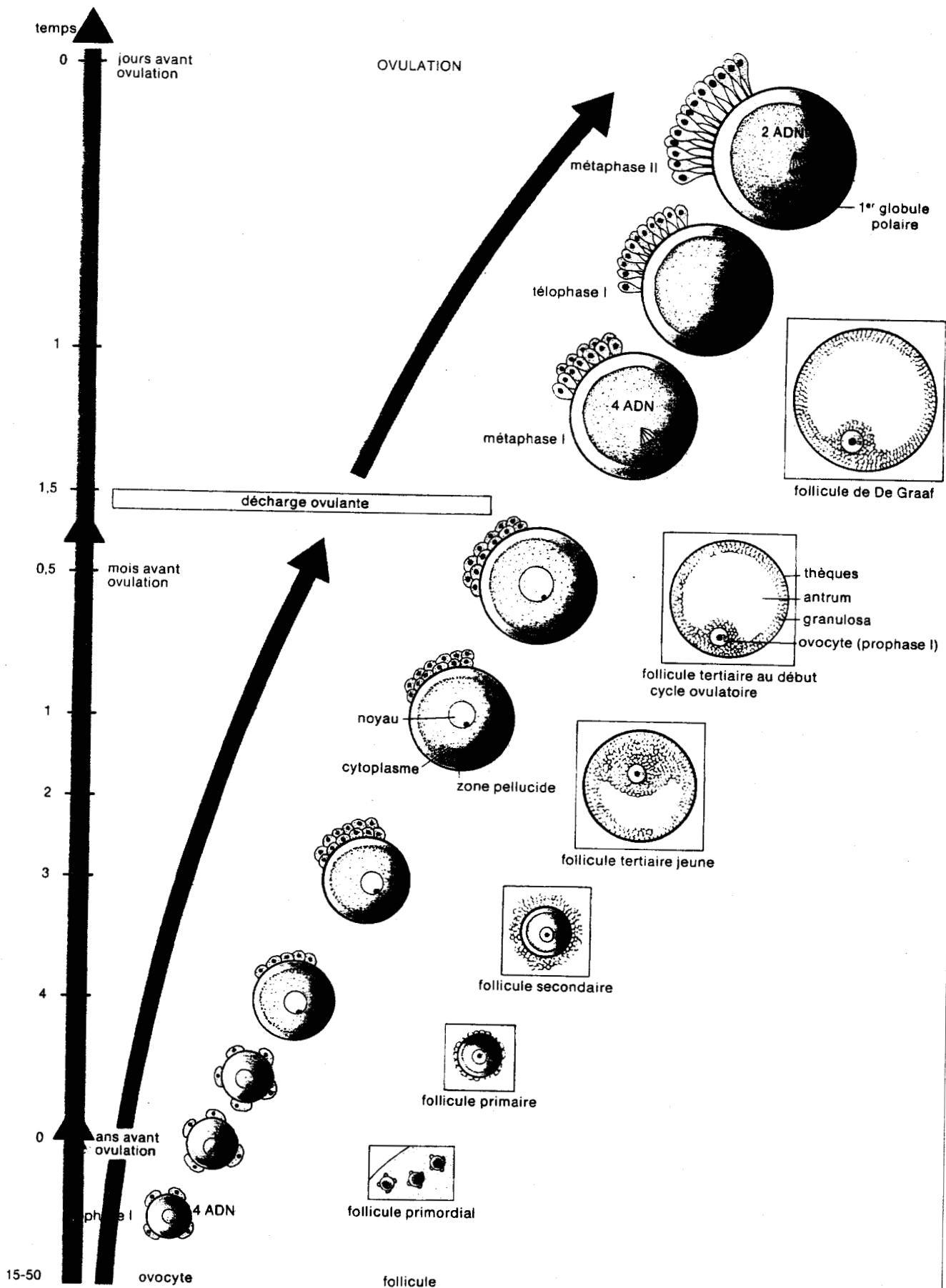
Le follicule primordial est formé d'un ovocyte bloqué en prophase de première division méiotique (prophase I) et de quelques cellules de la pré-granulosa aplaties ou endothéli-formes.

Les follicules primordiaux constituent un "pool" quiescent de réserve qui s'établit pendant la vie foetale, chez l'homme, ou en post-natal chez les rongeurs. Les follicules primordiaux quittent de façon continue le pool de réserve, sous forme de vagues de croissance folliculaire de la naissance et durant toute la vie, chez les rongeurs, ou jusqu'à la ménopause chez la femme.

Dès sa sortie du stock quiescent, le follicule va passer par différents stades de croissance et de différenciation pour finalement aboutir au stade préovulatoire (follicule de De Graaf).

La première étape de la folliculogénèse est la transformation du follicule primordial en follicule primaire : les cellules de la pré-granulosa se différencient en cellules cubiques organisées sous forme d'un épithélium unistratifié autour de l'ovocyte. Ce sont les premières cellules de la granulosa. La couche de granulosa est délimitée extérieurement par une lame basale appelée "membrane de Slavjanski"

L'ovocyte, d'autre part, élabore une couche mucopolysaccharidique qui l'isole des cellules de la granulosa : la



zone pellucide.

La prolifération des cellules de la granulosa aboutit à la formation du follicule secondaire (jusqu'à 6 à 8 couches de cellules). A ce stade, commencent à se différencier les cellules de la thèque à partir des fibroblastes environnants. Le moment de la formation du tissu thécal en périphérie de la granulosa varie en fonction des espèces.

Dès l'apparition de la thèque interne, il se forme des cavités entre les cellules de la granulosa qui s'emplissent de liquide folliculaire. Celles-ci vont finalement fusionner pour donner l'antrum (ou cavité antrale) dans lequel s'accumule le liquide folliculaire qui contient nutriments, hormones et autres facteurs régulateurs (follicule tertiaire ou antral). La composition du liquide folliculaire (propre à chaque follicule) maintient les cellules dans un environnement très riche en hormones : ainsi, on considère que la concentration d'oestrogènes du liquide folliculaire d'un follicule cavitaire est 2000 fois supérieure à sa concentration sérique.

Lorsque le follicule atteint le stade préovulatoire, l'ovocyte entouré par les cellules du "cumulus oophorus" (groupement de cellules de la granulosa périovocytaires) baigne dans la cavité antrale. La thèque s'est hypertrophiée. Dans les heures qui suivent le pic sérique préovulatoire de LH, l'ovocyte reprend sa méiose et s'arrête en métaphase de deuxième division méiotique.

II. CROISSANCE FOLLICULAIRE

La croissance folliculaire va aboutir à l'édification, à partir de follicules primordiaux, d'un à plusieurs follicules de De Graaf après avoir franchi les étapes successives de follicules primaires, secondaires et tertiaires.

Une étape décisive est marquée par la différenciation de la thèque interne (fin du stade secondaire). A partir de ce moment, le follicule entre en phase stéroïdogène et l'activité endocrine de la thèque interne, en synergie avec la granulosa, conduit à la formation de la cavité antrale. C'est l'accumulation, dans le liquide antral, de nombreux facteurs hormonaux qui va être essentiellement responsable de la croissance rapide du follicule.

1°/ Conditionnement hormonal de la folliculogénèse

La granulosa est avasculaire et possède des récepteurs à FSH, présents dès le stade follicule primaire. La couche thécale est, elle, très vascularisée et possède uniquement des récepteurs à LH. Les deux types cellulaires coopèrent au sein du follicule : "théorie dualiste de l'origine des oestrogènes". Les cellules thécales synthétisent des androgènes sous l'action stimulante de LH. Ces androgènes traversent la membrane basale pour atteindre les cellules de la granulosa où ils sont aromatisés en oestrogènes sous l'effet stimulateur de FSH. Cette diffusion est rendue possible grâce à un gradient de concentration d'androgènes, de la thèque à la granulosa.

Les oestrogènes à ce stade ont un rôle paracrine et

agissent en synergie avec FSH pour stimuler la multiplication des cellules de la granulosa et l'apparition de l'antrum. Au stade tertiaire, les stéroïdes sont concentrés dans le liquide folliculaire et le rapport AND/OEST intra folliculaire conditionne l'évolution du follicule vers la maturation ou l'atrésie (l'augmentation de ce rapport est signe d'involution).

Progressivement et sous l'action conjuguée de FSH et des oestrogènes, les cellules de la granulosa des follicules tertiaires acquièrent des récepteurs à LH. Ces récepteurs sont principalement localisés sur les cellules de la granulosa murale (qui entourent l'antrum).

2°/ Sélection du follicule dominant

Au début de chaque cycle oestral, un ou plusieurs follicules tertiaires évolutifs sont sélectionnés et deviennent dominants. Leur domination s'exprime de plusieurs façons :

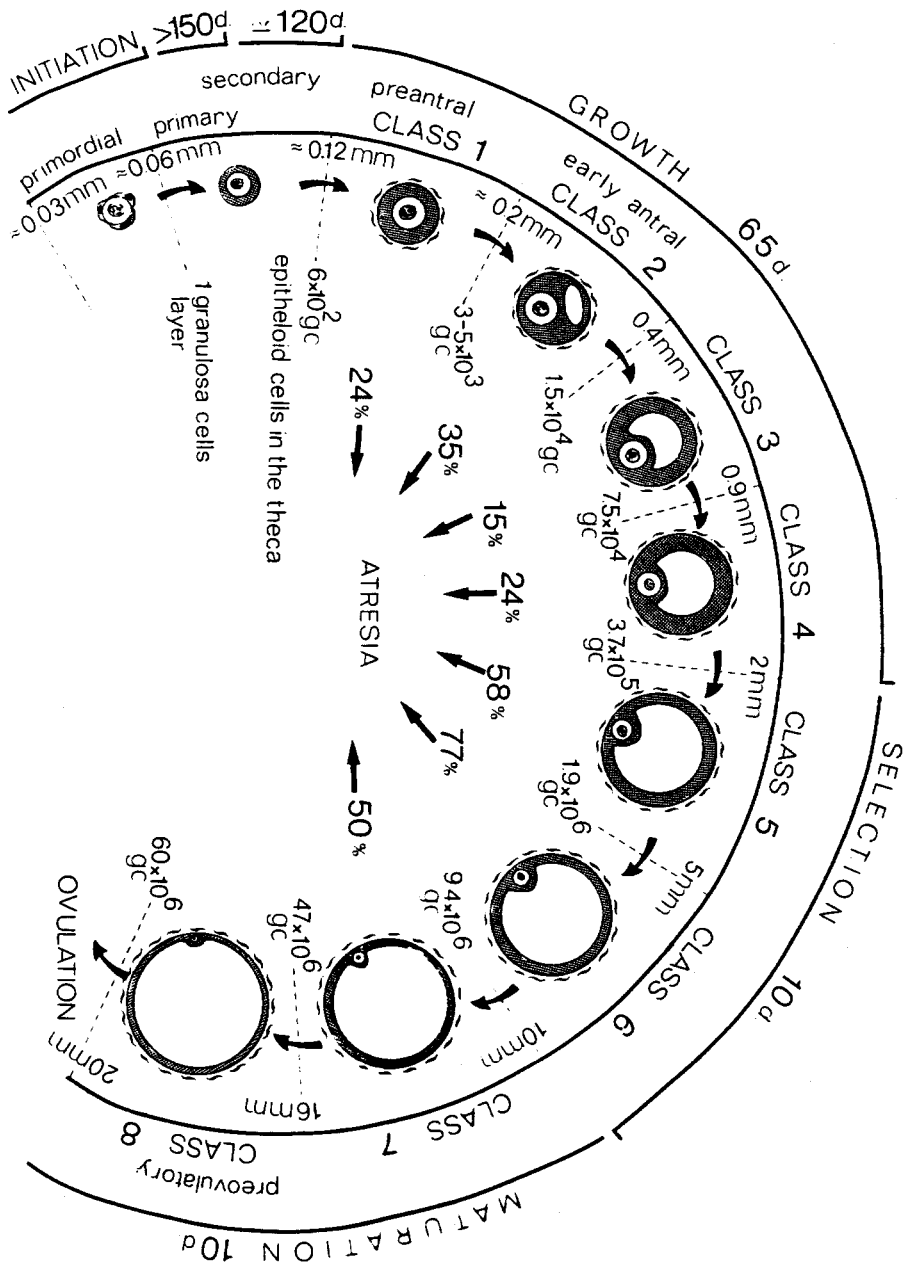
- ce ou ces follicules acquièrent un indice mitotique très élevé et de ce fait ont une croissance très rapide. Ils prennent rapidement une dominance par le diamètre.

Le taux de récepteurs à FSH par follicule s'élève en conséquence.

- les follicules dominants augmentent leur vascularisation thécale par la production de facteurs angiogéniques.

- ces follicules semblent exercer leur domination par inhibition de la croissance de nombreux follicules antraux.

(Figure n° 2). Gougeon et coll. (1986) ont démontré expérimentalement ce phénomène chez la femme : peu avant le pic préovu



latoire de LH, lorsque le follicule dominant est identifiable par sa taille, on procède à son ablation. Aucun grand follicule de classe 5 à 7, contemporains du follicule dominant excisé, n'est capable de murer jusqu'au stade préovulatoire. Une nouvelle ovulation ne se produit que 14 jours après l'opération. Ce délai correspond à une nouvelle vague de sélection d'un follicule de stade 4.

Le follicule dominant induit vraisemblablement l'arrêt de croissance et l'atrésie de tous les follicules tertiaires de stade 5 à 7. Les facteurs impliqués dans cette inhibition sont inconnus.

3°/ Maturation folliculaire

La maturation des follicules s'accompagne de l'apparition de récepteurs à LH sur les cellules de la granulosa sous l'influence de FSH.

La thèque s'hypertrophie et acquiert dans le même temps la capacité d'aromatisation des androgènes en oestrogènes. 90 % des oestrogènes sériques en fin de phase folliculaire sont synthétisés par la thèque interne du follicule dominant. La granulosa devient progressivement une structure sensible à LH. La théorie "dualiste de l'origine des oestrogènes" n'est plus applicable pour le follicule mature.

L'augmentation de la concentration sérique d'oestrogènes va réguler l'activité hypothalamo-hypophysaire et stimuler la production massive de gonadotrophines. Par rétrocontrôle positif, les oestrogènes induisent le pic sérique préovulatoire de LH (et FSH) qui conditionne l'ovulation. Sous l'influence

de doses massives de LH, l'ovocyte reprend sa méiose, les cellules de la granulosa se dissocient et se lutéinisent. (différenciation en cellules progestagènes). Il y a ovulation par expulsion du complexe cumulus ovocyte.

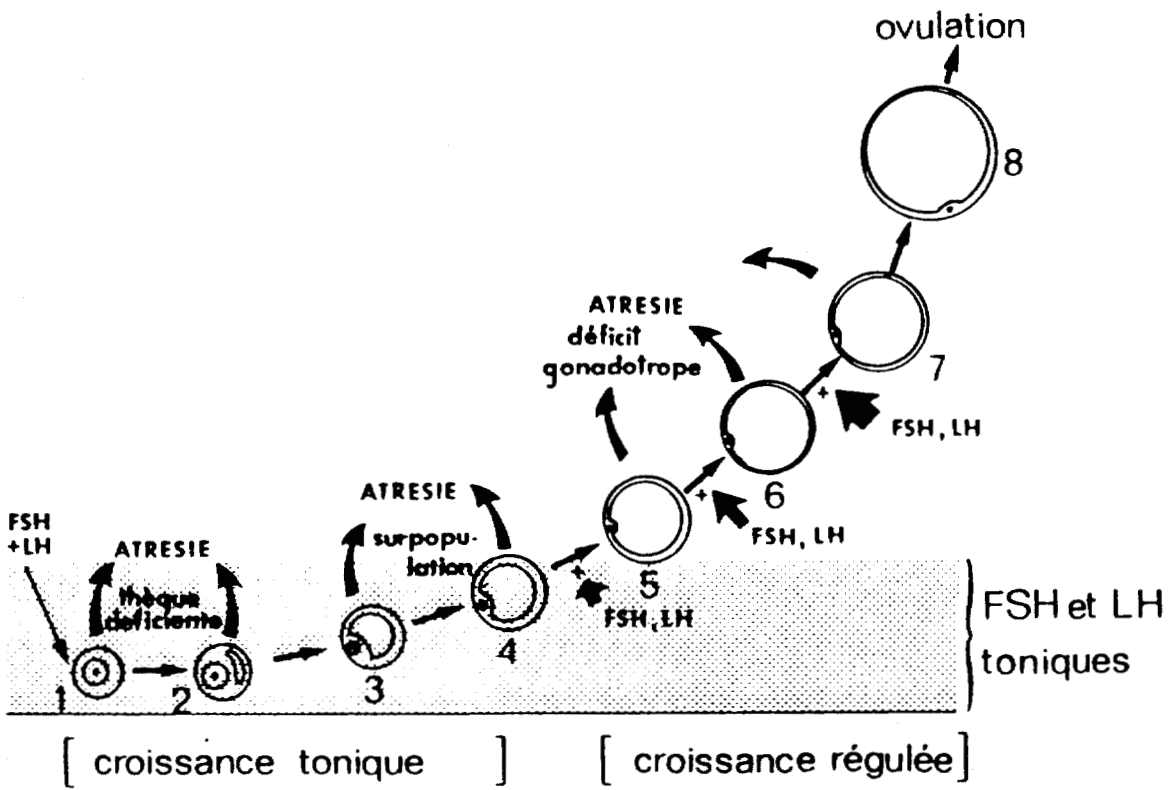
III. VAGUE DE CROISSANCE ET D'ATRESIE FOLLICULAIRE

La folliculogénèse est rythmée par de nombreuses vagues de croissance et d'atrésie touchant les follicules à tous les stades de leur développement. Ainsi, on constate que pour plusieurs centaines de follicules primordiaux débutant leur croissance, seulement un nombre limité aboutit à maturation complète (en général 5 à 10 chez les rongeurs et un seul chez l'homme).

Le pourcentage d'entrée en atrésie des follicules varie en fonction de leur stade de développement. En effet, la population folliculaire peut être divisée en trois catégories (Figure n° 3).

- Les follicules primordiaux à secondaires, dont le développement semble indépendant des gonadotrophines. Leur croissance est très lente et ces follicules semblent peu touchés par l'atrésie.

- Les follicules de classe 1 à 4 (préantraux et petits antraux) qui sont caractérisés par une atrésie d'intensité faible à moyenne, peu dépendante des variations hormonales chez l'adulte à activité hormonale cyclique. Il existe, également, une faible variation de leur indice mitotique. La croissance de ces follicules ne nécessite qu'un support gonadotrope minime assuré par la seule sécrétion tonique de



LH et FSH.

- Les follicules de classe 5 à 8 (stade préovulatoire) dont l'atrésie et l'activité mitotique varie fortement avec le stade du cycle chez l'adulte. Plus les niveaux de FSH circulant sont élevés, plus le pourcentage de follicules sains et leur activité stéroïdogène s'accroissent.

Le recrutement des follicules primordiaux est continu. Ce phénomène se traduit par l'existence d'une hétérogénéité folliculaire au sein de l'ovaire. Chaque stade folliculaire appartient à une vague de croissance différente.

La quantité de follicules préantraux et antraux de classe 2 à 4 reste constante tout au long du cycle oestral.

La mobilisation cyclique des follicules de classe 4 explique le rythme de l'ovulation. Ils entrent dans une phase de croissance dépendante des gonadotrophines et les variations cycliques des taux de ces hormones vont aboutir à la sélection des follicules dominants et à l'enclenchement de l'atrésie massive des follicules concurrents.

Les mécanismes impliqués dans cette phase terminale de la folliculogénèse, outre les variations hormonales classiques sont peu connus. L'intervention de nombreux facteurs paracrines est très nettement envisagée (inhibine, facteurs angiogéniques, IGF, facteurs LH-RH like). D'une façon générale, la folliculogénèse est très étudiée, en raison de son importance dans les applications humaines concernant la contraception, les stérilités féminines et les divers moyens de les combattre.

Dans le cadre de la procréation médicalement assistée (PMA), des analogues du LH-RH sont utilisés afin de bloquer l'activité hypothalamo-hypophysaire avant de stimuler hormonalement une superovulation. Cependant, des effets directs du LH-RH et de ses analogues ont été mis en évidence sur le fonctionnement ovarien chez le rat et autres mammifères (Rippel et coll. 1976, Ying et coll. 1979, Hsueh et coll. 1979, Corbin et coll. 1981, Ekholm et coll. 1981). Il est de plus en plus évident que des substances LH-RH like gonadiques (Aten et coll. 1985, 1986, 1987a et b) sont impliquées dans des régulations fines de la folliculogénèse. Leur étude sur le plan fondamental présente un intérêt nouveau en raison de leur utilisation massive en thérapeutique.

LH-RH OVARIEN

L'hormone "Luteinizing-Hormone-Releasing-Hormone (LH-RH) aussi appelée "Gonadotrophine-Releasing hormone (GnRH) est une molécule hypothalamique qui joue un rôle fondamental dans le contrôle de la reproduction chez les Mammifères. Le peptide a été isolé en 1971 par Schally et coll., dans l'hypothalamus où il est stocké dans les neurones Léonardelli et coll. 1973). Il est sécrété de façon pulsatile dans le plexus capillaire de l'éminence médiane et va se fixer sur des récepteurs hypophysaires. Le LH-RH stimule la libération cyclique des gonadotrophines LH et FSH par les cellules de l'hypophyse antérieure.

Plus récemment, le LH-RH ou des substances immunologiquement apparentées ont été mises en évidence dans des régions extrahypothalamiques du SNC, et dans des tissus périphériques tels que le placenta (Khodr et coll. 1980), les glandes mammaires (Baram et coll. 1977), et les gonades (Ying et coll. 1981). Des substances possédant des activités biologiques similaires à celles du LH-RH hypothalamique ont été également révélées dans le pancréas et dans des cellules tumorales.

Plusieurs arguments plaident en faveur du mode d'action paracrine des peptides LH-RH like dans la fonction ovarienne.

Tout d'abord, des effets directs du LH-RH et de ses analogues synthétiques ont été observés dans l'ovaire (Rippel et coll. 1976, Ying et coll. 1979, Hsueh et coll. 1979, 1981,

Corbin et coll. 1981, Ekholm et coll. 1981). Ces effets sont stimulateurs ou inhibiteurs, et cette action ambivalente dépend du stade de différenciation des follicules (Birnbaumer et coll. 1985), du taux de gonadotrophines circulantes (Liang et coll. 1989) et de l'activité stéroïdogène de l'ovaire (Sheela-Rani et coll. 1983).

Des récepteurs spécifiques du LH-RH ont été recherchés dans les ovaires de Mammifères. Ils ont été mis en évidence sur la membrane plasmique des cellules de la granulosa (Jones et coll. 1980), des cellules lutéales (Clayton et coll. 1979, Harwood et coll. 1980a) et des cellules thécales à tous les stades de différenciation (Pelletier et coll. 1982). Plus récemment, des récepteurs au LH-RH ont été détectés dans les ovocytes de rat (Dekel et coll. 1988). Les récepteurs ovariens du LH-RH ont les mêmes caractéristiques que les récepteurs hypothalamiques (Reeves et coll. 1980).

Il est peu probable que le LH-RH hypothalamique atteigne l'ovaire par la circulation générale en quantité physiologiquement active (activité peptidasique sérique importante).

En effet, le LH-RH se trouve en quantité infime dans la circulation générale (Fink 1976). Sa concentration est de $8 \cdot 10^{-12}$ M dans le plasma humain (Elkind-Hirsch et coll. 1982), 10^{-11} M chez le rat adulte (Eskay et coll. 1977), $\leq 10^{-15}$ M chez la Brebis (Nett et coll. 1974).

Sa dégradation rapide dans l'hypophyse, le cerveau, le foie et le sang (Bauer et coll. 1984, Koch et coll. 1984) lui confère une durée de vie moyenne de 2 à 3 minutes. Plusieurs

études rapportent la présence d'une substance LH-RH like dans le fluide folliculaire de porcins (Ying et coll. 1981), dans les ovaires de rat (Aten et coll. 1986), de bovins et ovins (Aten et coll. 1986, Ireland et coll. 1988), ainsi que dans les ovaires humains (Aten et coll. 1987b).

Récemment, les ARNm du LH-RH ont été détectés par Northern Blot (Sakakibara 1989) et mis en évidence par techniques d'hybridation in situ dans les cellules de la granulosa de rat (Liang et coll. 1989). Dans la même année, une tentative de purification des facteurs LH-RH like ovariens menée par Aten et coll. (1989a,b) a révélé une homologie (fixation sur les récepteurs et activité biologique in vitro) entre ces substances et l'histone H2A. Les auteurs en ont conclu que le LH-RH like gonadique n'était autre que l'histone H2A. Cependant une étude plus récente a infirmé cette hypothèse par le séquençage du ADNc ovarien du LH-RH de rat et la mise en évidence de sa grande homologie avec la séquence de l'ADNc hypothalamique connue (Oikawa et coll. 1990).

Notre étude a permis la mise au point d'un dosage du LH-RH afin de suivre les variations du taux de LH-RH-like ovarien dans différentes circonstances physiologiques et expérimentales. Cette technique doit nous permettre la quantification du LH-RH dans les extraits ovariens et fluides folliculaires avec la même sensibilité.

La mise au point du dosage E.L.I.S.A. du LH-RH a nécessité la fabrication d'anticorps polyclonaux par hyperimmunisation chez le lapin, la caractérisation des anticorps et l'optimisation du test immunoenzymatique.

Nous avons de plus caractérisé biochimiquement les substances immunoréactives extraites d'ovaires de Hamsters hyperstimulés. Nous avons ensuite étudié l'ontogénie de cette substance chez le rat.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. OBTENTION DES IMMUNSERUMS

Les immunosérums utilisés dans ce travail ont été produits dans notre laboratoire.

A. ORIGINE DE L'ANTIGENE

Le LH-RH synthétique a été obtenu chez UCB Bioproducts (Belgique).

Le LH-RH est un décapeptide de poids moléculaire 1182,5 Da (Figure n°4), de demi-vie de 4 à 8 mn. Il ne présente pas de spécificité d'espèce.

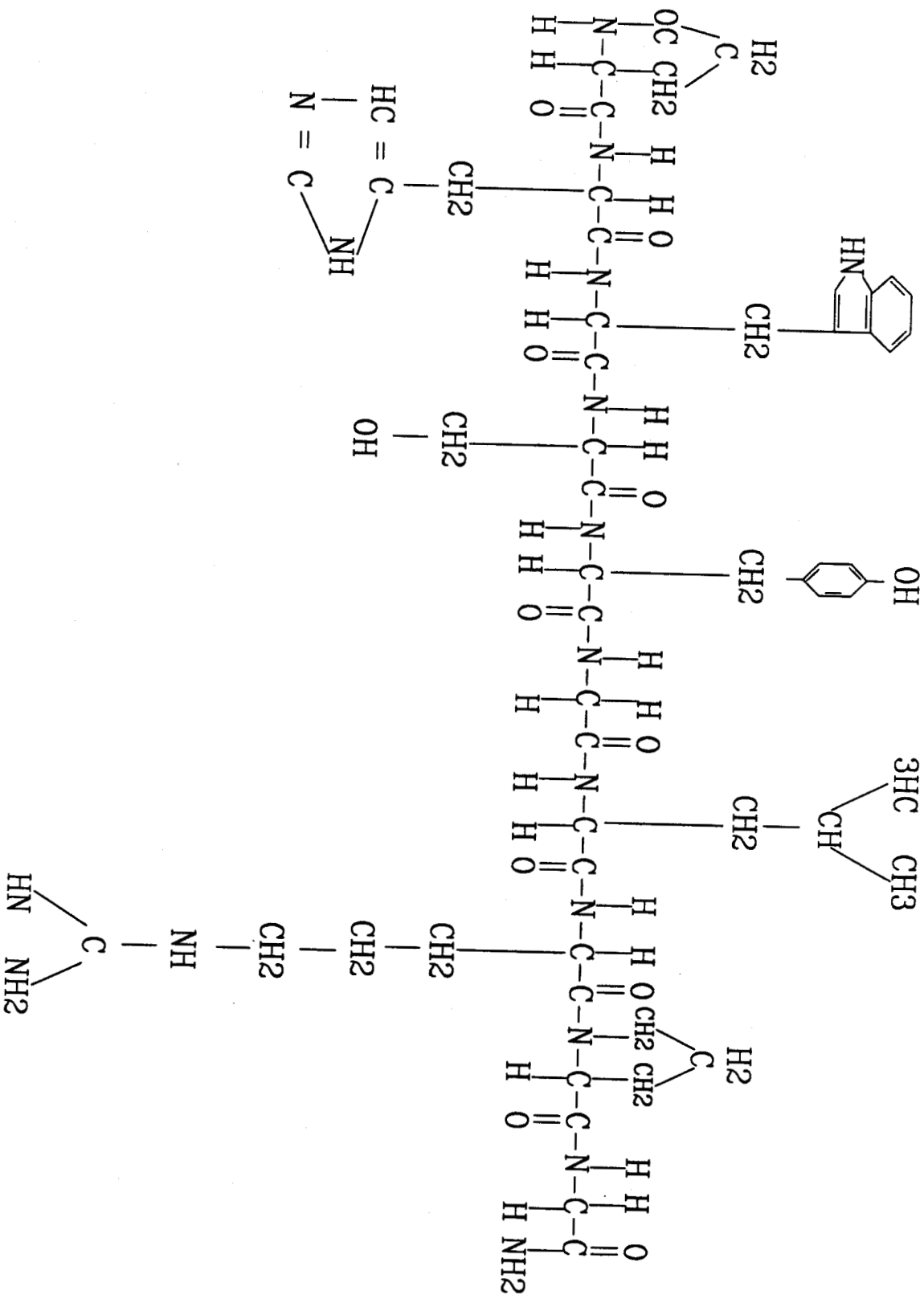
Les acides aminés en position 6 et 10 de la molécule interviennent dans sa capacité à se fixer sur les récepteurs L'histidine en position 2 et le tryptophane en position 3 seraient responsables de l'activité biologique (libération de FSH et LH). L'acide aminé en position 6 est le site d'action des enzymes peptidasiques.

Ainsi, par des substitutions, on peut obtenir soit des analogues très actifs : (D-Phe6)-LH-RH, (D-Trp6)-LH-RH..., ou à l'opposé, des inhibiteurs tel le (D-Phe2, D-Trp3, D-Phe6)-LH-RH (Schally 1978).

B. PROTOCOLE D'IMMUNISATION

L'antigénicité d'une protéine est en grande partie dépendante de sa taille. On considère qu'un polypeptide de poids moléculaire inférieur à 10.000 Da est peu immunogène. Dans le but d'augmenter l'antigénicité du peptide et donc d'augmenter la réponse immunitaire, le peptide est couplé à

Figure : Structure moléculaire du LH. RH. (d'après SCHALLY 1978)



1 Pyro Glu — His — Trp — Ser — Tyr — Gly — Leu — Arg — Pro — Gly — NH₂
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10

une protéine porteuse par l'intermédiaire d'un agent couplant

1°/ Choix de la protéine porteuse

Le but de notre étude étant la fabrication d'anticorps anti LH-RH en vue d'une étude immunohistochimique sur coupe et de la mise au point d'un dosage ELISA quantitatif du LH-RH dans les milieux biologiques (milieu de culture, extraits tissulaires), la nature de la protéine porteuse s'est révélée très importante. En effet, la protéine porteuse généralement utilisée est la sérum albumine (bovine ou humaine).

L'albumine, protéine sérique, est également présente dans la plupart des tissus, dont l'ovaire (Krischna et coll. 1989). Par ailleurs elle est utilisée dans diverses techniques biochimiques comme agent saturant, notamment dans les techniques de dot-immunobinding et ELISA. Habituellement les étapes de présaturation de l'antisérum par l'albumine sont utilisées pour éviter les réactions non spécifiques dues à la présence d'anticorps anti albumine. Pour simplifier la méthode, nous avons choisi d'utiliser la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), hémoglobine d'Invertébré, qui présente l'avantage de n'être pas présente, par définition, dans les milieux biologiques de Mammifères.

2°/ Couplage du peptide synthétique à la KLH par le glutaraldéhyde (Vance et Coll. 1968).

a. matériel

- * KLH (Sigma)
- * glutaraldéhyde 0.02 M dans le tampon phosphate
- * LH-RH synthétique (UCB, Bio-product)

* tampon de couplage : tampon phosphate 0.1M, pH 7.2

* solution de bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 8 mM dans le dans tampon phosphate.

b. protocole

- 5 mg de KLH sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate 0.1M pH 7.2

- 5 mg de LH-RH sont dissous dans 1 ml de sérum physiologique

- sous agitation constante, les deux solutions ci-dessus sont additionnées et on y ajoute goutte à goutte 1 ml de la solution de glutaraldéhyde à 0.02 M

- laisser sous agitation 3 h à température ambiante

- la réaction est stoppée par addition de 0.5 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.

- dialyse pendant 48 h contre une solution à 0.9 % de NaCl

- le dialysat est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Agent couplant

glutaraldéhyde $\text{HOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$

Couplage

peptide-NH₂ + protéine-NH₂ + $\text{HOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$

peptide-NH=CH-(CH₂)₃-CH=N-protéine

+

H₂O

3°/ Protocole d'immunisation (Figure n° 5)

Nous avons utilisé la méthode d'hyperimmunisation par injection intradermique multiple (Vaitukaitis et coll. 1971) qui donne en général de très bons résultats.

Avant inoculation, l'antigène couplé (500 µg dans 0.5ml d'eau physiologique) est émulsionné avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Deux lapins ont été utilisés, à plusieurs mois d'intervalle. Un des lapins est mort au bout de 3 mois d'immunisation pour une raison inconnue.

Premier Jour

- L'animal préalablement tondu sur le dos, reçoit une dose d'antigène couplé (500 µg) émulsionné, sous forme d'une quarantaine d'injections intradermiques. Aux points d'injection se produit une réaction inflammatoire avec granulome. La libération d'antigène se fait progressivement (c'est l'une des hypothèses permettant d'expliquer une réponse accrue).

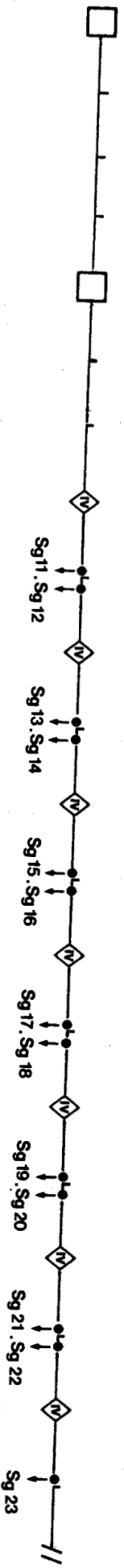
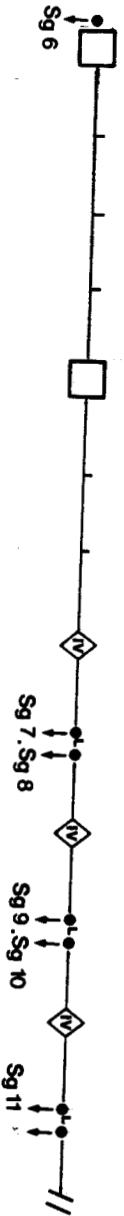
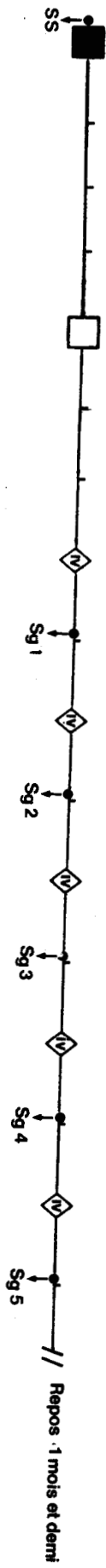
- L'animal reçoit en supplément une dose de 1ml de vaccin anticoquelucheux (Perthydral, Institut Pasteur) et 1 ml de vaccin BCG, ce qui permet d'augmenter la réponse immunitaire par un effet amplificateur.

1 mois après : 1er rappel

- L'animal reçoit un premier rappel constitué d'une dose d'Ag émulsionnée dans l'adjuvant incomplet de Freund en injection intradermique multiple (quarantaine d'injections)

21 jours suivant : Protocole de stimulation et de saignée

- L'animal reçoit une dose non émulsionnée d'Ag couplé



- Immunisation
- Rappel
- ◇ Intraveineuse
- Saignée (Sg)

par voie veineuse dans la veine marginale de l'oreille

- Le sixième jour suivant cette injection, l'animal est saigné à l'oreille.

En moyenne 20 à 30 ml de sang sont prélevés à chaque saignée. Ce protocole est renouvelé tous les 15 jours :

Plusieurs cycles d'injection intraveineuse et de saignées sont effectués. L'animal est ensuite mis au repos pendant 1 mois et demi.

C. VERIFICATION DE LA PRODUCTION D'Ac PAR DOT-IMMUNOBINDING

(Hawkes et Coll. 1982)

Chaque saignée est testée en dot-immuno-binding afin de visualiser la présence ou l'absence d'anticorps.

1°/ Matériel

- feuille de nitrocellulose (pores de diamètre 0.10 μm)
- * Tampon TBS (Tris HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 0.15 M)
- * Tampon TNT (tampon TBS 10 mM, Tween 20 0.1 %)

2°/ Procédé

- Préparation de feuilles de nitrocellulose

Le filtre de nitrocellulose est préalablement quadrillé à l'aide d'un crayon de bois en carrés de 5 mm de côté avant d'être lavé 5 à 10 minutes dans l'eau distillée.

2.5 μl d'une solution à 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de LH-RH synthétique dans le TBS sont déposés sur la feuille de nitrocellulose au centre des carrés.

Les bandes de nitrocellulose sont ensuite séchées à 60°C pendant 1h dans une étuve saturée en vapeur de paraformaldéhyde afin de fixer les peptides.

Juste avant utilisation, la nitrocellulose est incubée 10 mn à 4° C puis stabilisée dans le TBS 5 à 10 mn.

- Réaction immunologique

* blocage des sites non spécifiques : 2 agents bloquants ont été testés, la BSA et le lait en poudre.

Les bandes sont placées dans des tubes à hémolyse contenant 3 ml de BSA à 3% dans le TBS ou 3 ml de lait à 5 % dans le TBS pendant 1 nuit sous agitation constante. La saturation des sites non spécifiques par le lait provoque une nette diminution du bruit de "fond" observé après BSA.

* Lavage : à la fin de chaque étape, les bandelettes sont rincées dans 4 ml de TBS sous agitation constante durant 10 mn, puis deux fois en TNT.

* Incubation en présence de l'antisérum dilué au 1/500 dans le TNT contenant 1 % de lait pendant 3h à température ambiante sous agitation constante.

* Lavage : élimination des anticorps non fixés par aspiration puis lavage en TNT, 3 X 10 mn .

* Incubation en présence du 2ème antisérum de mouton anti Ig de lapin marqué à la peroxydase. (Diagnostics Pasteur, Paris) au 1/100 dans le TNT contenant 1 % de lait durant 1h00 à température ambiante.

* Lavage TNT 2 X 10 mn

TBS 2 X 10 mn

* Révélation de la réaction immunologique par un substrat de la peroxydase, la diaminobenzidine. (D.A.B.)

0.5 µg DAB / ml TBS

2 μ l H_2O_2 / ml TBS

La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration brune en 2 à 15 mn.

Lorsque la réaction est suffisamment intense, les bandes sont rincées à l'eau distillée, séchées à l'air libre puis montées en planche.

D. PURIFICATION DES ANTICORPS

1°/ Précipitation des protéines par les sels

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les protéines de précipiter quand on augmente la force ionique du milieu. Le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium. Par précipitation successive d'un sérum, on obtient des fractions protéiques différentes (cf. tableau n° 2).

Tableau n° 2

sulfate d'ammonium :	nature des protéines
saturé (vol/vol) %	précipitées
25	fibrinogène
33	IgG
40	IgG + IgA + Igm
50	+ β globulines
70	albumines

Nous avons travaillé à 33 % de sulfate d'ammonium

* Tampons et solutions

- sulfate d'ammonium en solution saturée :

préparation d'une solution de sulfate d'ammonium 6 M dans l'eau distillée

dissoudre en chauffant

neutralisation si nécessaire avec de l'ammoniaque ou de l'acide sulfurique 2N

Des cristaux doivent se former au refroidissement prouvant la saturation.

- tampon phosphate salin PBS 0.1 M, 0.15 M NaCl, pH 7.4.

Des échantillons de 2 ml d'antisérum sont dissous dans un volume égal (V) de PBS. La solution est placée sous agitation magnétique lente dans un récipient contenant de la glace pilée.

Le volume (X) requis de la solution de sulfate d'ammonium saturé est ajouté goutte à goutte :

80

$$X = \frac{\quad}{60} V$$

60

La solution est refroidie 10 mn

centrifugation 20 mn à 3000 tpm

Le culot est repris par un volume de sulfate d'ammonium à 33%

centrifugation 20 mn à 3000 tpm

dialyse contre 1 litre de PBS. Le tampon est renouvelé

après une heure de dialyse et la dialyse se prolonge toute la nuit.

2°/ Préparation des IgG de lapin sur protéine A sépharose

La protéine A de *Staphylococcus aureus* réagit avec la partie Fc des IgG.

Son affinité vis à vis des différentes immunoglobulines et des sous classes d'immunoglobulines dépend de l'espèce animale qui les a produites. Ainsi, pour le lapin, les immuno-

globulines fixées par la protéine A sont des immunoglobulines G avec quelques traces d'immunoglobulines M.

a. matériel

Protéine A sépharose (Pharmacia)

colonne de chromatographie (2 X 10 cm)

b. tampons et solutions

tampon phosphate disodique 0.1 M, pH 8

tampon citrate 0.1 M ajusté à pH 6 et pH 4.5 avec
l'acide citrique 1 M

Solution pH 3 , acide acétique 0.1 N contenant 0.15 M
NaCl

c. méthode

1.5 g de protéine A Sépharose sont gonflés dans le
tampon phosphate 0.1 M à pH 8 pendant 30 minutes.

La colonne est rincée avec le tampon phosphate.

1 ml d'antisérum préalablement dialysé une nuit contre
le tampon phosphate pH 8 est déposé sur le gel..

Rinçage avec le tampon phosphate jusqu'à obtention d'une
densité optique inférieure à 0.05 (λ : 280 nm).

Les IgG fixées sont ensuite éluées par passages
successifs de tampons à pH acides.

Les fractions de 1 ml sont récupérées, neutralisées par
le tampon phosphate à pH 8 contenant 0.02 % d'azide de sodium
avant d'être dosées au spectrophotomètre.

Les fractions correspondant au pic d'éluion des IgG
sont rassemblées et dialysées contre du tampon PBS, pH 7.4.

II. METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

A. PREPARATION DES TISSUS

L'application d'une technique immunologique sur un tissu pour une étude histologique nécessite l'établissement d'un "compromis" entre une morphologie et une réaction Ag-Ac de bonne qualité. En effet, la fixation d'un tissu, basée sur l'utilisation de traitements chimiques coagulants ne doit pas provoquer une dénaturation importante de l'antigène à révéler. Le temps de fixation est donc un facteur important des réactions immunohistochimiques. Le degré de dénaturation de l'antigène dépend également de la nature du fixateur utilisé.

1°/ Fixation

L'influence du fixateur sur la détection d'hormone polypeptidique a préalablement été étudié sur une gamme de 9 fixateurs différents (Tramu 1980). Les meilleurs marquages sont observés après utilisation de fixateurs contenant du formol et du sublimé :

- Bouin Hollande Sublimé
- Formol Sublimé
- Fixateur Stieve

Nous avons testé ces trois fixateurs sur des pièces d'ovaires de rats et avons retenu le fixateur Stieve qui provoque moins de bruit de fond que les deux autres.

Composition du Stieve : Sublimé 76 %, Formol 2%, Acide acétique 4 %.

La durée de la fixation dépend du volume des pièces opératoires. Les ovaires sont coupés en pièces n'excédant pas

5 mm et fixées 1h30 à 2h dans le fixateur Stieve.

2°/ Inclusion en paraffine

Deshydratation et inclusion des pièces sont réalisées sur 24 heures par passage successifs dans des bains de :

- alcool 70° (2 bains)
- alcool 95° (2 bains)
- alcool absolu (1 bain)
- toluène (2 bains)
- paraffine (2 bains)

Les pièces incluses sont ensuite moulées dans des blocs de paraffine de 8 cm .

3°/ Coupe et montage sur lame

Des coupes de 6 µm sont réalisées par l'utilisation d'un microtome et collées sur lame à l'aide d'eau albumineuse. Les lames sont séchées une nuit à 37° C.

Composition de la solution albumineuse concentrée

albumine d'oeuf 5 % 1g

glycérol 40 % 8ml

salicylate de sodium 2.5 % 0.5 g dans H₂O

Eau albumineuse (préparation extemporannée) à 25 %
dans H₂O

B. REACTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Nous avons utilisé la méthode indirecte, en 2 temps : l'immunsérum spécifique se lie aux antigènes recherchés. La fixation des anticorps est révélée par l'addition d'un deuxième anticorps anti-immunoglobuline de l'espèce à laquelle appartient le premier anticorps, conjugué à la peroxydase.

1°/ Déparaffinage des lames, par passages successifs dans les bains de :

- toluène 3 X 20 mn
- alcool 95° 3 X 5 mn
- alcool iodé 70° 1 x 3 mn (élimine le sublimé)
- alcool à 70° 1 X 5 mn
- eau courante 1 X 15 mn

2°/ Application du sérum spécifique

L'anticorps est appliqué à une dilution de 1/200 dans le tampon Coons pH 7.2.

Tampon Coons

- véronal sodique 0,02 M
- NaCL 0,3 M dans l'eau distillée

Le pH est ajusté avec HCl 1N

L'incubation en chambre humide à 4° C dure une nuit.

3°/ Application du sérum marqué

Après passage dans 3 bains de lavages (Coons pH 7.2) les lames sont incubées en présence d'anticorps de mouton anti Ig de lapin conjugué à la peroxydase à la dilution de 1/100 dans le Coons.

L'incubation se déroule à température ambiante pendant 30 minutes.

4°/ Révélation de la peroxydase

Deux substrats de la peroxydase ont été utilisés : la diaminobenzidine tétra-HCl et le 4-Chloro-Naphtol.

a. Utilisation de la diaminobenzidine (DAB) (Graham et Karnovsky 1966)

* 50 mg de DAB sont dissous dans 100 ml de tampon TRIS 0.1 M, pH 7.6 et additionnés de 0.003 % d'H₂O₂.

* Procédé

Les lames sont rincées : 5 mn dans le tampon Coons
15 s dans de l'eau distillée
15 s dans le tampon Tris

Puis, elles sont incubées quelques minutes dans la solution de révélation DAB. L'apparition d'un précipité brun est contrôlé au microscope, la révélation est arrêtée par immersion dans l'eau distillée.

Les lames sont ensuite deshydratées par passages successifs dans des bains d'alcool 70°, 95°, absolu, toluène puis montée à l'Eukitt.

b. Utilisation du Chloronaphtol (Nakane 1968).

* 40 mg de 4-Chloro-1-Naphtol sont dissous dans 1 ml de DMF (diméthylformamide).

* 100 ml de tampon Tris 0.1 M, pH 7.6 sont ajoutés en agitant à l'aide d'une barre de verre le mélange, de manière à prévenir la formation d'un précipité floconneux indésirable.

* 250 µl d'H₂O₂ à 30 % sont ajoutés

* Procédé

Les lames sont rincées comme précédemment (Coons, H₂O Tris) et incubées dans la solution de révélation. Un précipité bleu-violet apparaît en quelques minutes. La lamelle ne

peut être montée en Eukitt car le précipité est soluble dans le toluène. La lamelle est donc montée dans la glycérine.

III. IMMUNOENZOMOLOGIE

A. DEFINITION

L'immunoenzymologie regroupe les méthodes immunologiques d'identification et de quantification d'antigène, d'haptène ou d'anticorps utilisant des enzymes comme marqueurs (d'antigène ou d'anticorps) et la mesure d'une activité enzymatique comme amplificateur de la réaction.

Les réactions immunoenzymologiques utilisent différents principes en fonction de leur finalité.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux techniques immunoenzymologiques quantitatives. Nous avons choisi une technique adaptée au faible poids moléculaire de la substance à doser. Pour le dosage de petites molécules, on utilise préférentiellement des dosages par compétition.

Nous avons donc opté pour l'utilisation d'un système de dosage compétitif adapté aux circonstances suivantes :

1. Nous avons à notre disposition l'antigène LH-RH de référence à l'état purifié (UCB Product, Belgique).
2. Nous disposons d'un anticorps anti LH-RH polyclonal dont la purification n'est que partielle.

La technique de dosage que nous avons utilisée est un dérivé de la technique Competitive Enzyme Linked Immunoassay (C.E.L.I.A.). (Ternynck et Coll. 1987). Elle utilise comme réactif, l'antigène de même spécificité que l'antigène à doser, fixé sur la phase solide. La compétition a lieu alors

entre l'antigène à doser et l'antigène fixé sur la phase solide, vis à vis de sites anticorps en défaut (par rapport à la quantité d'antigène adsorbé).

La quantité d'anticorps fixé sur l'antigène adsorbé est déterminée en ajoutant un deuxième anticorps anti-Ig en excès conjugué à la peroxydase. L'activité enzymatique est révélée par addition d'un substrat chromogène puis mesurée (Figure n° 6).

Elle est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène compétiteur.

B. PARAMETRES DE LA REACTION

1°/ Adsorption de l'antigène

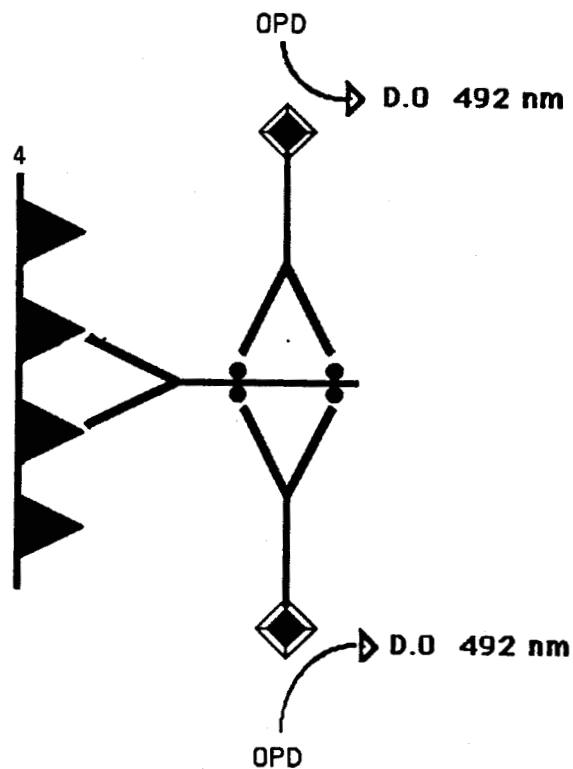
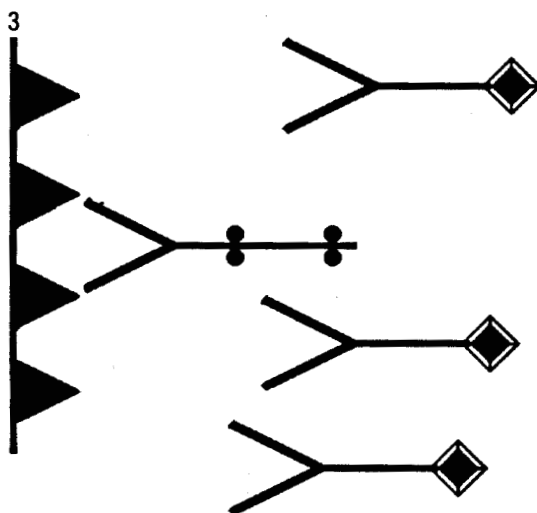
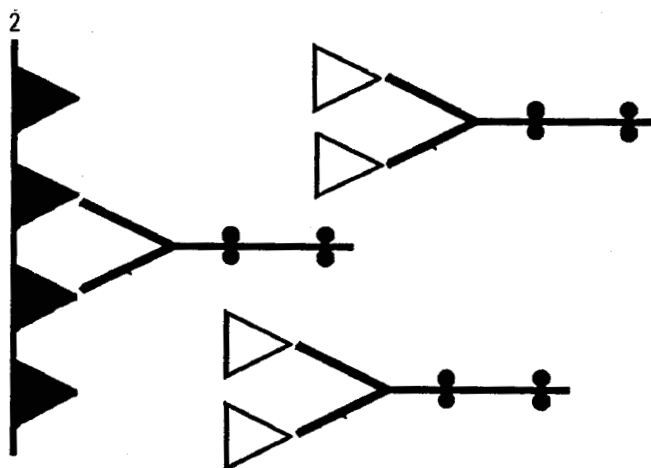
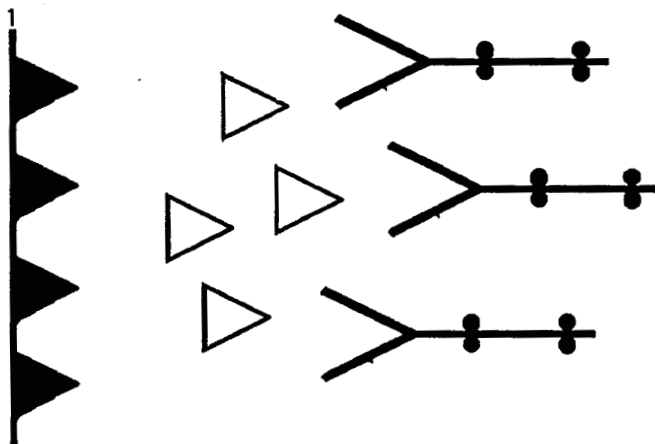
La fixation des protéines sur des surfaces plastiques est liée à un phénomène d'adsorption physique passive : la plupart des protéines s'adsorbent par des interactions hydrophobes entre les structures non polaires des protéines et une matrice plastique non polaire (Catt et Coll. 1967).

Différents paramètres influent sur la qualité de la fixation :

* Influence de la taille des particules antigéniques

La taille des particules antigéniques influence directement la fixation (Dugimont 1977), les plus grosses se fixent mal et sont éliminées par les premiers lavages.

Par ailleurs, la reproductibilité de la fixation oblige à travailler avec des antigènes relativement purs.



* Influence du tampon

Les tampons les plus couramment utilisés sont

- le tampon carbonaté de sodium 0.1 M pH 9.6
- le tampon phosphate salin PBS 0.1 M, 0.15 M NaCl,
pH 7.4

Nous avons testé la performance de ces deux tampons. Les deux systèmes ont donné des résultats équivalents. Nous avons opté pour l'utilisation du tampon PBS 0.1 M à pH 7.4.

* Temps d'incubation et température

La fixation de l'antigène est rapide. Un temps d'incubation de 2h à 37°C est satisfaisant.

Les plaques peuvent être conservées de façon efficace à 4°C après avoir été fixées puis vidées.

2°/ Conditions de saturation

Le processus d'adsorption est un processus non spécifique. Ainsi, au cours des incubations avec les anticorps il peut se produire des adsorptions non spécifiques.

Cette adsorption non spécifique est minimisée de trois façons.

* les sites restés libres après fixation sont bloqués par des "agents saturants". Nous avons utilisé le lait lyophilisé écrémé à 1 % dans le PBS.

* les différentes incubations se font en présence d'un détergent non ionique tel que le Tween 20 à 1 % dans le PBS. Il n'interfère pas dans la réaction Ag-Ac, mais évite la formation de nouvelles interactions hydrophobes entre les protéines additionnées et la phase solide.

L'addition de Tween 20 ne semble pas perturber l'adsorption de l'antigène de façon appréciable.

* les étapes de lavages sont également réalisées en tampon PBS contenant du Tween.

3°/ Protocole

a. matériel

Microplaques non stériles à 96 puits de volume réactionnel 200 µl (Costar, U.S.A.)

Lecteur de plaque E.L.I.S.A. (Flow Laboratories, U.S.A. Titertek Multiskan plus MK II)

Laveur automatique (Flow Laboratories, U.S.A. Titertek Microplate Washer S8/S12)

Micro-ordinateur Victor VPC IIc, Imprimante Epson LX 800

Programme informatique, Flow Laboratories, Titertek Soft

b. Tampons et solution

Tampon Phosphate Salin (PBS) 0.1 M, pH 7.4

Tampon PBS - Tween 0.1 % - lait en poudre 1 %

Substrat (préparé extemporanément) pour l'activité peroxydase pH 5

chromogène : orthophényldiamine 0,04% dans

le tampon phosphate 0.2 M, acide citrique 0.2 M

H₂O₂ 0.0003 %

Acide sulfurique H₂SO₄ 2N

c. Protocole

* Fixation de l'antigène

Les solutions d'antigène sont incubées 2h30 à 37° C en

présence de 1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonylfluoride).

* Lavages : 3 fois dans du PBS-Tween 0.1 %

* Saturation des sites "non spécifiques"

Incubation : 1h30 à 37° C avec une solution saturante constituée de 1 % de lait dans le PBS.

* Lavages : 3 fois dans du PBS-Tween 0.1 %

* Incubation avec l'anticorps anti LH-RH : les solutions d'anticorps diluées dans du PBS-Tween-lait sont incubés 1 nuit à température ambiante. Les plaques sont recouvertes de parafilm et placées à l'abri de la lumière.

* Lavages : 3 fois dans du PBS-Tween

* Incubation avec le deuxième anticorps de mouton anti-immunoglobulines de lapin conjugué à la peroxydase dilué au 1/1000 dans le PBS-Tween-lait 1h30 à 37° C

* 1 lavage PBS-Tween

* 2 lavages PBS

* Révélation de l'activité peroxydase : 200 µl de la solution de révélation sont introduits dans chaque cupule. Une coloration se développe (4 mn).

La réaction est stoppée par l'addition de 50 µl d'une solution H₂SO₄ 2N.

* Lecture des résultats : spectrophotomètre à 492 nm.

IV. EXTRACTION DU LH-RH

A. EXTRACTION PAR ULTRACENTRIFUGATION

1°/ Matériel

Ultracentrifugeuse (Beckman SI65)

Tampon

tampon phosphate	0.1 M
NaCl	0.15 M
β mercaptoethanol	10 mM
PMSF	1 mM (dissous dans l'éthanol)
pH	7.4

2°/ Protocole

Les ovaires sont pesés, puis broyés sous azote liquide au Spex Freezer (Bioblock Scientific).

Le broyat ainsi récupéré est homogénéisé à 4° C dans le tampon d'extraction (10 ml/g tissu) au Polytron.

L'homogénat est centrifugé à 55 000 X g pendant 1 h. La fraction cytosolique est récupérée par aspiration, puis lyophilisée.

Avant la lyophilisation, 50 μ l du cytosol sont récupérés pour doser les protéines extraites (dosage bio-rad).

B. EXTRACTION EN MILIEU ORGANIQUE (Burgus et coll. 1973)

Cette technique a été utilisée à l'origine pour l'extraction du LH-RH à partir d'hypothalamus d'ovins.

1°/ Solutions

éthanol	810 volumes
chloroforme	90 volumes
acide acétique	5 volumes
eau distillée	95 volumes

2°/ Protocole

Les ovaires (stockés à -20°C dans de l'HCl 0,1 N) sont broyés au Spex-Freezer puis homogénéisés dans 15 ml/g de milieu d'extraction à 4°C (Polytron).

L'homogénat est centrifugé 30 mn à $3\ 000 \times g$ (4°C). Le surnageant est récupéré et le culot extrait à nouveau par un volume égal de milieu d'extraction, puis recentrifugé de la même façon.

Les deux surnageants sont réunis, évaporés sous azote, et repris dans l'eau distillée contenant 1mM de PMSF avant d'être lyophilisés.

V. CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE DE GEL FILTRATION**1°/ Matériel**

Colonne de verre diamètre 1 cm
longueur 31 cm

billes de Séphadex G15 (Pharmacia Fine Chemicals)

2°/ Phase mobile

HCl 0.01 N pH 2

la chromatographie est effectuée en HCl 0.01 N pour deux raisons :

- le pH acide permet d'éviter les contaminations bactériennes

- l'utilisation d'HCl permet une lyophilisation directe des pics sans dessalage préalable.

3°/ Procédé

La solution d'HCl est dégazée par chauffage jusqu'à ébullition pendant 30 minutes.

Le gel est gonflé dans la solution d'HCl trois heures à 20°C (1g de billes donne 3 à 4 ml de gel).

Le gel est coulé dans la colonne puis stabilisé pendant 24 h par l'HCl à un débit de 10 ml/h.

La colonne est calibrée par le passage successif de 4 marqueurs de poids moléculaires :

- * bleu dextran PM 2 000 000 Da
- * LH-RH synthétique PM 1182.5 Da
- * Met Enképhaline PM 500 Da
- * Bichromate de sodium PM 287.5 Da

4°/ Chromatographie des échantillons

Les échantillons ovariens lyophilisés sont repris dans l'HCl 0.01 N à raison de 1 ml pour 5 mg de protéines.

Deux ml de reprise sont déposés sur le gel

Le débit de la colonne est ajusté à 10 ml/h. Chaque fraction de 0.5 ml est récupérée, passée au spectrophotomètre à 230 nm puis stockée à - 20° C.

VI. WESTERN BLOT (Towbin et Coll. 1979, Tsang et Coll. 1983).

La technique de "blotting" des protéines combine la résolution analytique de l'électrophorèse et la haute spécificité de la réaction immunologique Ag-Ac. Cette technique est très utilisée pour l'analyse et la caractérisation des protéines dans un mélange complexe. Le blotting des protéines, "Western blot", consiste à séparer les protéines d'un mélange sur un gel de polyacrylamide, à les transférer sur un filtre (nitrocellulose, nitronylon etc...) et à détecter les protéines immobilisées par une réaction d'affinité faisant intervenir des anticorps.

1°/ Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

a. matériel

cuve à électrophorèse

solutions pour la réalisation du gel de polyacrylamide SDS

Solution 1A	Tris	3 M dans H ₂ O
	HCl 1N	48 %
	TEMED	0.46 %
Solution 1B	Tris	0,5 M dans H ₂ O
	H ₂ SO ₄ 1N	25.6 %
Solution 2A2	Acrylamide	48 %
	Bisacrylamide	1.28 % sans H ₂ O
	Persulfate d'ammonium	100 mg/μl
	sodium dodécyl sulfate (SDS)	à 10 %

Tampon d'électrophorèse

Tris	0,025 M dans H ₂ O
Glycocolle	14,4 %
SDS	1 %

Solution colorante des échantillons

Tampon 1 B dilué au 1/10	1 ml
Glycérol	5 ml
Bleu de bromophénol	3 mg

b. Protocole

b1. Préparation du gel de polyacrylamide

	2A2	1A	H2O	SDS	Temed	Persul
Gel de concen.						
à 7.5 % (20 ml)	3ml	5ml	12ml	200µl	10µl	100µl
Gel de séparat.						
à 12.5 % (60 ml)	15ml	15ml	30ml	600µl	30µl	300µl

Le gel de séparation est coulé dans le moule jusqu'à 7cm du haut des plaques. Il est ensuite recouvert d'isobutanol (3 à 4 mm) . Une fois le gel polymérisé, l'isobutanol est éliminé. La surface du gel est ensuite rincée à l'eau distillée et séchée à l'aide de papier filtre. Le gel de concentration est coulé de la même façon et les plaques dentelées sont déposées à la surface jusqu'à polymérisation.

b2. Pré-électrophorèse et électrophorèse

Une pré-électrophorèse "à vide" (sans dépôt excepté la solution colorante qui sera la référence de migration) est effectuée pendant 1h ; ensuite 100 µl des échantillons et des étalons (SDS molecular weight warkers, Sigma Chemical Company) dilués dans le tampon d'électrophorèse sont déposés dans les puits.

La migration s'effectue à 140 volts, 40 mA pendant 3 h dans un système réfrigérant à +4°C.

2°/ Transfert sur nitrocellulose par électroélution

a. Matériel

Système "sandwich"

2 grilles supports

2 scotchs brites

2 feuilles de papier Watman

2 feuilles de nitrocellulose de 0.45 µm d'épaisseurs.

Cuves d'électrotransfert : même cuve que pour l'électrophorèse.

Tampon de transfert 25 mM tris HCl, 192 mM glycine, 20 % méthanol pH 8.8

Colorant amidoschwartz 0.1 % dans méthanol 45 % acide acétique 10 %

Décolorant : méthanol 90 %, acide acétique 2 % dans H₂O

b. Protocole

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est démoulé et placé dans le système "sandwich". Le transfert s'effectue pendant 4 heures à 400 mA et à 4°C.

L'efficacité du transfert est vérifiée en colorant le gel par la solution d'amidoschwartz.

L'absence de bandes sur le gel permet de vérifier si le transfert a été correctement effectué.

3°/ Détection immunologique (voir Dot-immuno-binding)

VII. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY EN POLARITE DE PHASE INVERSE C 18

1°/ Matériel

Colonne C18 μ Bondapak

Pompes : waters associates chromatography pumps

Spectrophotomètre : $\lambda = 230$ nm

2°/ Solvants

acide trifluoroacétique (TFA) 11mM

acetonitrile (ACN)

solvant A : TFA 11 mM dans H₂O distillée

solvant B : TFA 11 mM dans acetonitrile

3°/ Procédé

gradient linéaire de 25 % B à 85 % B en 60 min, à raison de 1 % / min.

la pression est de 1000 PSI (30 PSI = 2 bars)

le débit est de 1 ml/min

la détection se fait à 230 nm

100 μ l de la solution échantillon et de la solution étalon (1 mg/ml dans le TFA 11 mM) sont injectés séquentiellement dans la colonne. L'apparition d'un pic est détectée au spectrophotomètre à 230 nm.

PREMIERE PARTIE

MISE AU POINT DU DOSAGE E.L.I.S.A. COMPETITIF DU LH-RH

MISE AU POINT DU DOSAGE E.L.I.S.A DU LH-RH

I. DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ANTIGENE OPTIMALE A FIXER

L'adsorption physique d'antigène sur les plaques possède deux inconvénients majeurs :

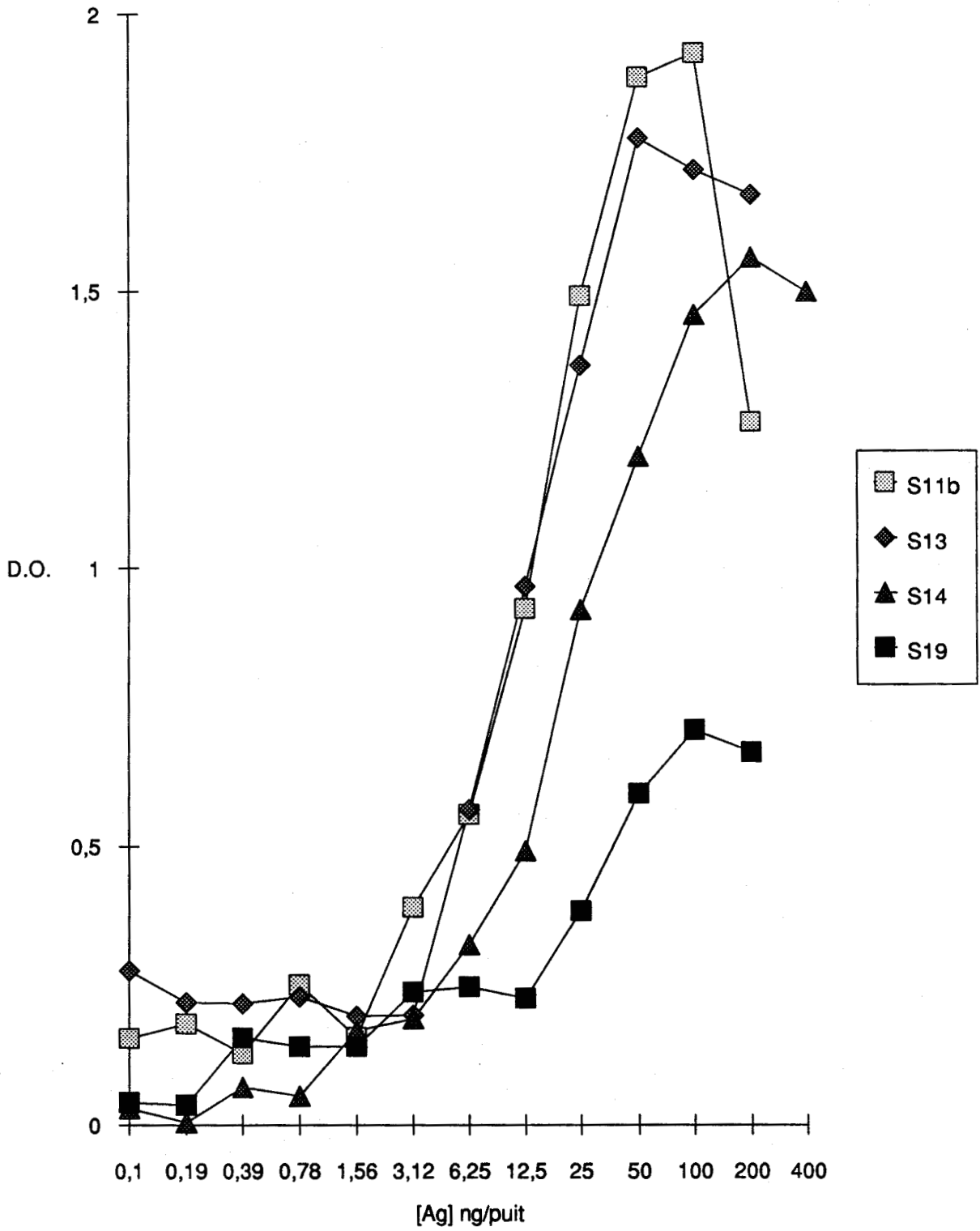
- deux plastiques de structure identique ne possèdent pas toujours la même capacité d'adsorption et de plus, des phénomènes de désorption sont observés au cours des séries de lavages. Dans certains cas, cette perte a pu être estimée à 30 % (Engvall 1980).

Pour faire face à cet inconvénient, il est donc nécessaires, pour chaque lot de plaques utilisé, de redéterminer la capacité d'adsorption du plastique.

- Quelque soit la nature du support utilisé, la sensibilité du dosage dépend pour une part appréciable de la quantité du réactif immunologique fixé. Lorsque la quantité d'antigène fixé augmente, la sensibilité du dosage augmente puis atteint une valeur maximale avant de décroître rapidement.

Ceci nous a amené à déterminer la quantité d'antigène optimale à fixer sur les plaques pour obtenir le maximum de sensibilité dans le dosage. Pour cela des quantités croissantes d'antigènes sont adsorbées dans les puits et sont amenées à réagir avec l'antisérum dilué au 1/2000. On constate que la liaison des anticorps spécifiques, sur les antigènes adsorbés, passe par un maximum au fur et à mesure que la quantité d'antigène augmente, (Figure n°7) puis décroît : la quantité d'antigène pouvant se fixer dans les

DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ANTIGENES



puits est limitée (plateau théorique). Mais, une partie de l'antigène adsorbé en excès risque de se détacher au cours des incubations. Les antigènes éliminés au cours de la réaction peuvent inhiber la fixation des anticorps sur les antigènes immobilisés.

Ainsi, à de fortes concentrations en antigène, on observe une chute de la fixation d'anticorps. Ce phénomène indésirable est appelé prozone.

La concentration optimale en antigène correspond à celle permettant d'avoir la réaction Ag/Ac optimale (100 % d'anticorps fixés).

Les résultats montrent que cette concentration se situe entre 0.25 et 1 $\mu\text{g/ml}$ de LH-RH en fonction des saignées. On constate, de plus, que le résultat dépend de la dilution du sérum utilisé. A une dilution d'anticorps plus forte, cette concentration optimale tend vers des quantités plus faibles en antigène.

La quantité d'antigène à fixer dépend donc de la saignée utilisée et de sa dilution. Une fois ces quantités déterminées, on constate une bonne reproductibilité des résultats de dosages.

II. DETERMINATION DE LA DILUTION OPTIMALE DE L'ANTICORPS

1°/ Détermination des meilleures saignées

Une sélection rapide des saignées est effectuée en fixant l'antigène à une concentration optimale moyenne (0.5 µg/ml) et en faisant réagir les différentes saignées à une dilution fixée arbitrairement à 1/2000.

La densité optique développée par chaque réaction est révélatrice de la quantité de complexes Ag-Ac formés.

La courbe de variation du taux de fixation Ag-Ac en fonction des saignées, est donnée dans la figure n° 8.

On constate que dès les premières saignées, une réponse anticorps spécifique est déjà établie. La réponse Ag-Ac atteint un maximum 15 jours après les premières scarifications. Après chaque rappel, on observe une augmentation de la réponse immunitaire qui s'estompe en un mois et demi.

Les saignées présentant la plus forte réaction Ag-Ac sont sélectionnées (Sg 3, 9, 10, 11, 11bis, 15, 16, 18).

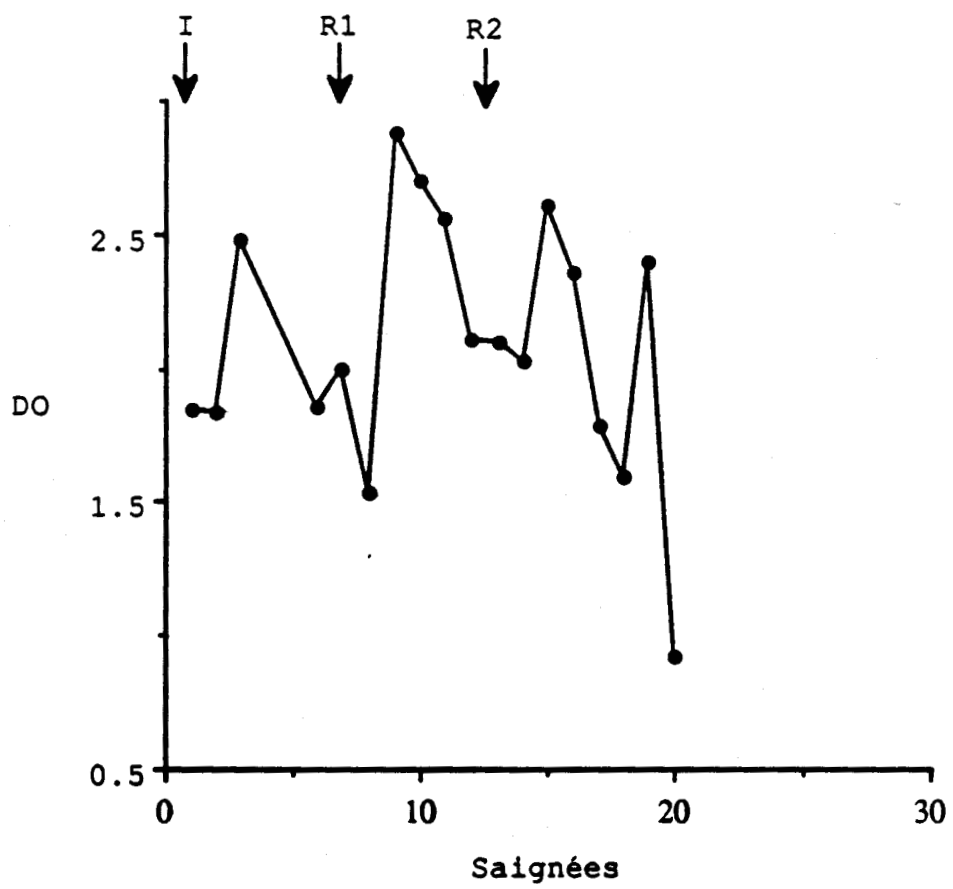
2°/ Titre en anticorps des saignées

Le titre d'un antisérum peut être exprimé de plusieurs façons :

- prise en compte de la dilution extrême qui donne une densité optique supérieure à 0.05 après soustraction de la valeur du témoin négatif

- inverse de la dilution qui fixe 50 % de l'antigène.

Seules les saignées sélectionnées ci-dessus sont titrées.



COURBE DE TITRES

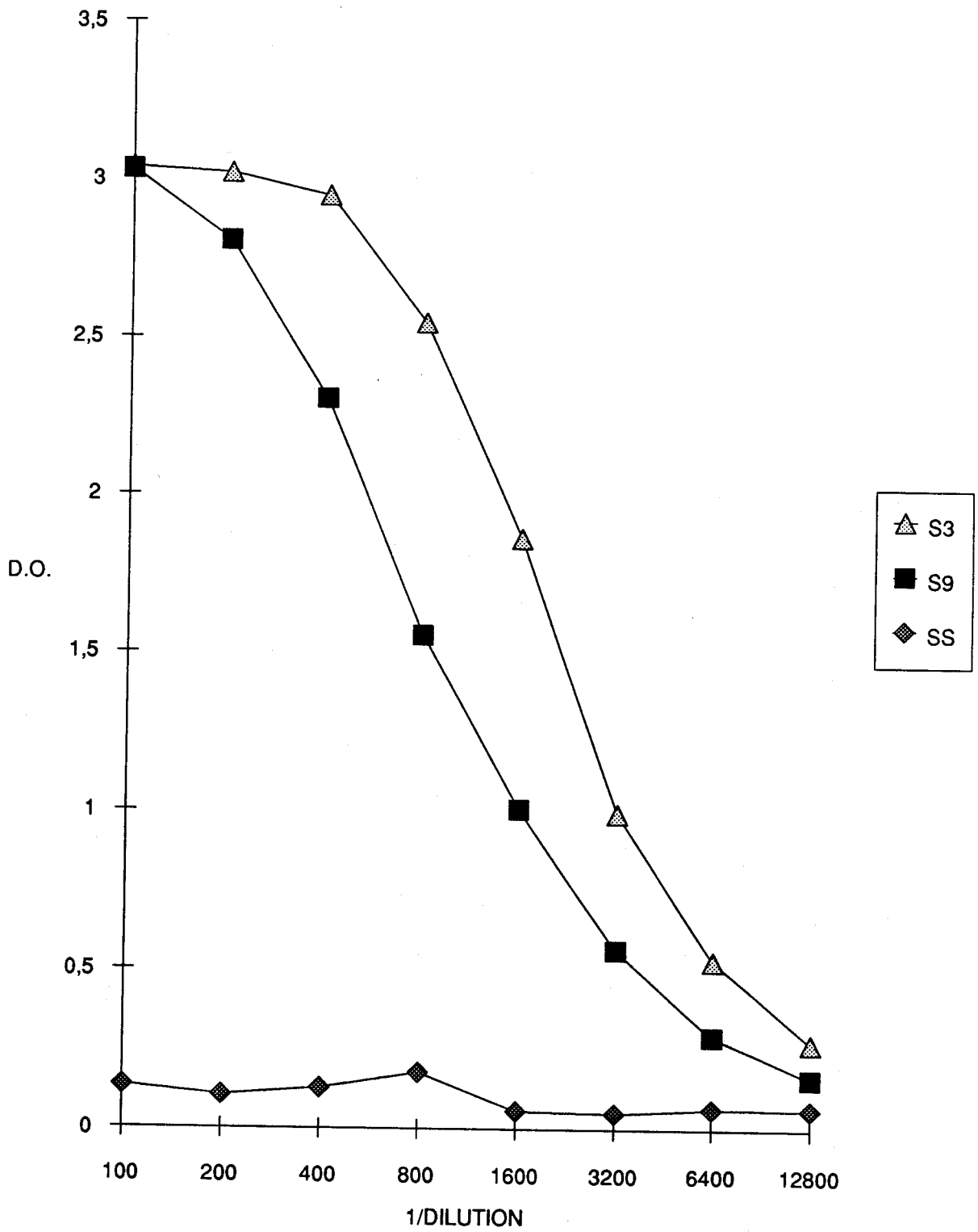


Tableau n° 3

SAIGNEE	INVERSE DE LA DILUTION 50 %	DILUTION EXTREME
3	2240	>1/12 800
9	1000	12 800
10	3000	16 000
11	1500	12 800
11 bis	800	10 000
15	1000	12 800
16	1000	12 800
18	800	8 000

Le titrage d'anticorps s'effectue en 5 étapes

- 1) immobilisation de l'antigène sur la surface solide.
- 2) Saturation des sites libres
- 3) Incubation avec l'anticorps anti LH-RH des différentes saignées à tester (diluées deux en deux).
- 4) Incubation avec l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase
- 5) Révélation de la peroxydase par un de ses substrats colorimétriques.

L'absorbance mesurée par spectrophotométrie est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'antisérum.

La courbe de titre obtenue pour certaines saignées est donnée dans la figure n° 9.

Les titres en anticorps sont compilés dans le tableau n° 3.

Dans notre protocole de dosage E.L.I.S.A. du LH-RH nous devons nous trouver en défaut d'anticorps par rapport à la quantité d'antigènes adsorbés. Nous nous placerons donc à une dilution d'anticorps correspondant à 50 % de fixation d'après la courbe de titre. Cette dilution varie en fonction des saignées

III. METHODE

* Adsorption du LH-RH synthétique

200 µl d'une solution de LH-RH (dilution optimale de 0.25 µg/ml à 1 µg/ml en fonction de la saignée utilisée) sont déposés dans chaque puit.

La plaque est incubée pendant 2h00 à 37° C.

* Trois lavages en PBS - Tween 20

* Saturation par les protéines du lait

* Trois lavages en PBS - Tween 20

* Compétition

100 µl de la solution d'anticorps (dilution finale correspondant à la valeur "titre 50 %") dans le PBS-Tween-lait sont déposés dans les puits. Puis 100 µl de dilution d'antigène étalon ou d'échantillons sont ajoutés.

La plaque est incubée 1 nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière.

* Trois lavages en PBS Tween 20

* Incubation avec l'anticorps anti Ig de lapin conjugué à la peroxydase à une dilution de 1/1000 dans le PBS-Tween

* Un lavage en PBS-Tween 20

* Deux lavages en PBS

* Révélation de l'activité peroxydasique

* La réaction est arrêtée avec 50 µl de H₂SO₄ 2N.

IV. VALIDATION ET CONTROLE DES RESULTATS

1°/ Etablissement des courbes de référence

a. expression des résultats

La modification du pourcentage d'anticorps se fixant sur la plaque sous l'influence de l'addition d'antigène étalon ou d'échantillon à doser est exprimée en ordonnée par le rapport

$$\frac{(B - N) \times 100}{B_0 - N}$$

Bo - N

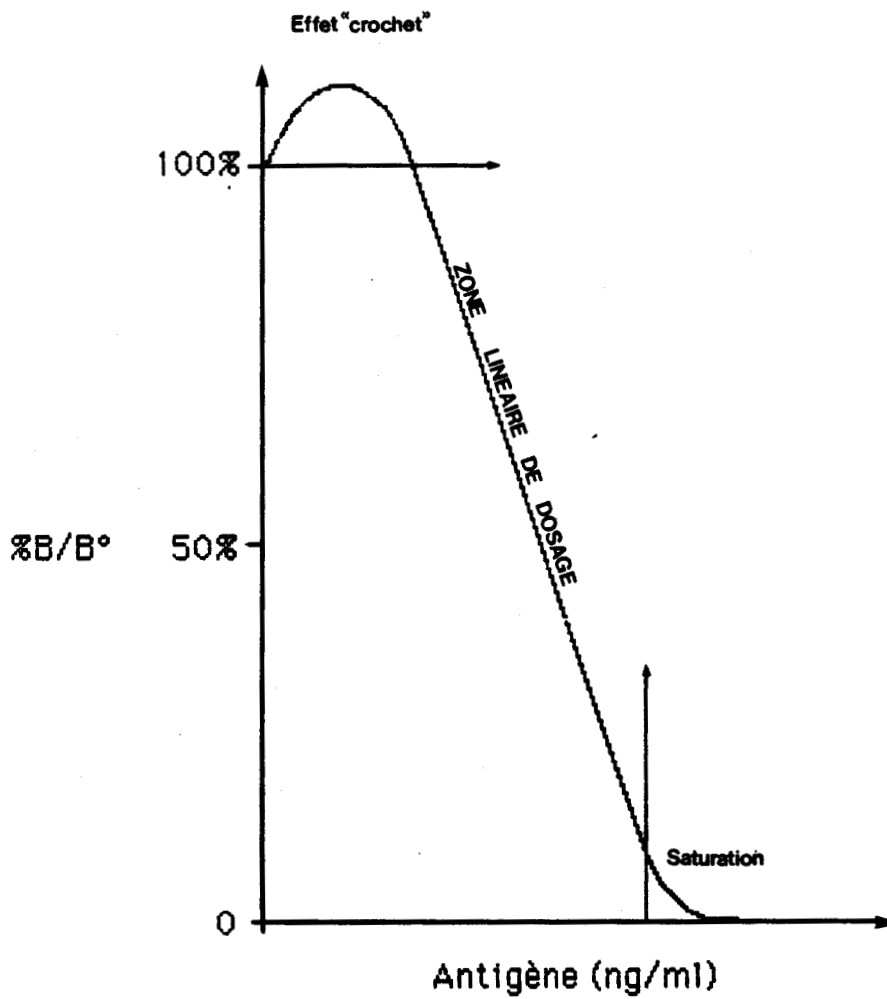
Bo est la densité optique liée à la fixation d'anticorps spécifique sur l'antigène fixé en l'absence d'antigène étalon. N représente la densité optique du témoin "négatif" où l'antisérum est substitué par du sérum sain
B est la densité optique résultant de l'addition d'étalon et d'échantillon.

En abscisse sont placées les valeurs de la concentration d'antigène étalon ajoutée dans le milieu réactionnel (échelle semilogarithmique). La représentation graphique ainsi déterminée permet l'obtention d'une courbe étalon dont une portion est linéaire.

b. détermination de la "zone de dosage"

Les effets de zones représentent un phénomène classique des immunodosages (Figure n° 10).

Figure n° 10



En effet, la réaction immunologique ne se produit pas à l'équilibre. Ce protocole limite donc l'exploitation du

dosage dans le domaine des valeurs élevées de la gamme étalon en raison de l'"effet crochet" connu sous le nom de "high dose hook effects". Ce phénomène a été démontré dans les techniques radioimmunométriques.

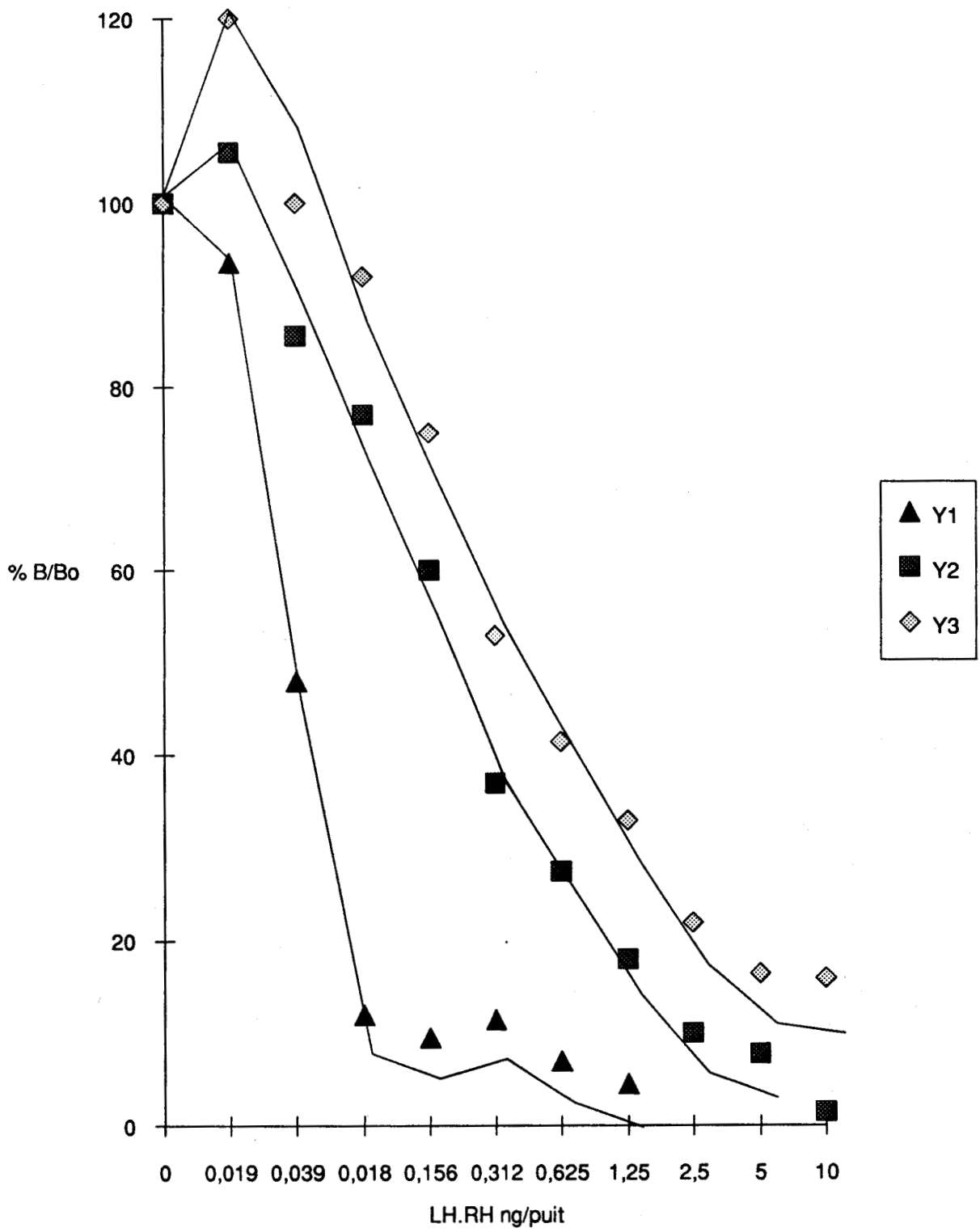
Lorsque la compétition a lieu avec de faibles doses d'antigène étalon (ou d'échantillon), on n'observe pas d'inhibition de fixation.

Il se produit un phénomène "rebond" où le pourcentage de fixation de l'anticorps sur l'antigène fixé est supérieur. La quantité minimale d'antigène provoquant une compétition dépend de l'affinité de l'anticorps. La figure n° 11 montre les phénomènes de "High dose hook effect" et les différences de sensibilité observées pour trois saignées d'affinité différente.

La deuxième limite de dosage se situe dans les hautes valeurs d'antigène, lorsque l'anticorps est saturé. Cette quantité "d'épuisement" constitue la limite maximale du dosage.

La technique doit être adaptée à la quantité d'antigène présente dans les échantillons. Le dosage sur milieu riche en antigène s'effectue en série de dilution (2 ou 3 dilutions de l'échantillon) afin de pouvoir se situer dans la zone linéaire de la gamme étalon.

Une fois la zone de dosage déterminée sur un échantillon on peut adapter le dosage sur une grosse série en utilisant une saignée adaptée.



Quoiqu'il en soit, il faut rappeler que les échantillons trop concentrés peuvent donner des valeurs de dosage aberrantes en raison de l'encombrement provoqué par la trop grande concentration protéique (ils peuvent de plus engendrer une résorption des antigènes adsorbés). Le dosage en double dilution est donc étendu à tous les échantillons.

En raison de l'effet "rebond", l'échantillon pauvre en antigène doit être concentré au maximum (lyophilisation). L'utilisation d'une saignée très affine est nécessaire.

Quoiqu'il en soit, la sensibilité du dosage en limite l'étude ; de ce fait, certains "faux négatifs" ne peuvent être évités.

2°/ Contrôle des résultats

Ils concernent les qualités du protocole et impliquent les performances des différents réactifs.

a. Références positives et négatives

Il est indispensable pour l'interprétation des résultats de dosage de disposer de références positives et négatives de la réaction immunologique dans sa totalité.

5 tests sont effectués soit systématiquement (a - c - e) soit au moment du test des anticorps (b - d).

1- évaluation de la fixation totale spécifique :
incubation de l'anticorps en l'absence d'antigène étalon

2- évaluation de la fixation non spécifique des immunoglobulines ou des protéines sériques non spécifiques :
incubation avec le sérum non immun du lapin (avant immunisation).

3- évaluation de la réaction non spécifique due à la fixation anormale d'anticorps anti Ig conjugué à la peroxydase : incubation avec du tampon PBS (en substitution à l'antiserum spécifique).

4- évaluation de la réaction non spécifique due à la révélation peroxydasique : au moment de la mise en jeu du second anticorps anti espèce conjugué à la peroxydase, on substitue cette étape par une incubation en tampon PBS.

5- évaluation du pourcentage d'adsorption non spécifique au cours de différentes incubations : toute la réaction immunologique du dosage est effectuée dans des puits vides, sans Ag adsorbés.

Le pourcentage de réadsorption non spécifique est une valeur reproductible s'échelonnant de 2 à 6 % en fonction des séries de dosage. Ce pourcentage est rendu faible grâce à l'utilisation d'agent tensio-actif tel que le Tween 20, et à la saturation par le lait des sites restés libres après adsorption.

b. Spécificité du dosage

La spécificité du dosage dépend exclusivement des propriétés immunologiques de l'anticorps (affinité, réaction croisées).

La spécificité d'un anticorps dépend de sa capacité à discriminer des déterminants antigéniques voisins mais différents en se liant avec une affinité différente.

b1 spécificité intrinsèque

La spécificité intrinsèque de l'anticorps anti LH-RH a été déterminée par l'utilisation de trois fragments du LH-RH vendus par la Société UCB.

PyroGlu - His - Trp fragment N-terminal

Ser - Tyr - Gly fragment central

Leu - Arg - Pro - Gly - NH₂ fragment C-terminal

b2 Réactions croisées avec un analogue du LH-RH, le décapeptyl (D. Trp⁶ LH-RH)

Le décapeptyl est un analogue du LHRH modifié en C6 par la substitution de l'acide aminé Glycine par le Tryptophane. L'acide aminé n° 6 est le point d'attaque d'enzymes protéolytiques qui dégradent la molécule et limitent sa durée de vie. La substitution en C6 permet la formation d'un analogue résistant, très utilisé en thérapie (protocole de stimulation de la F.I.V.E.T. chez l'homme).

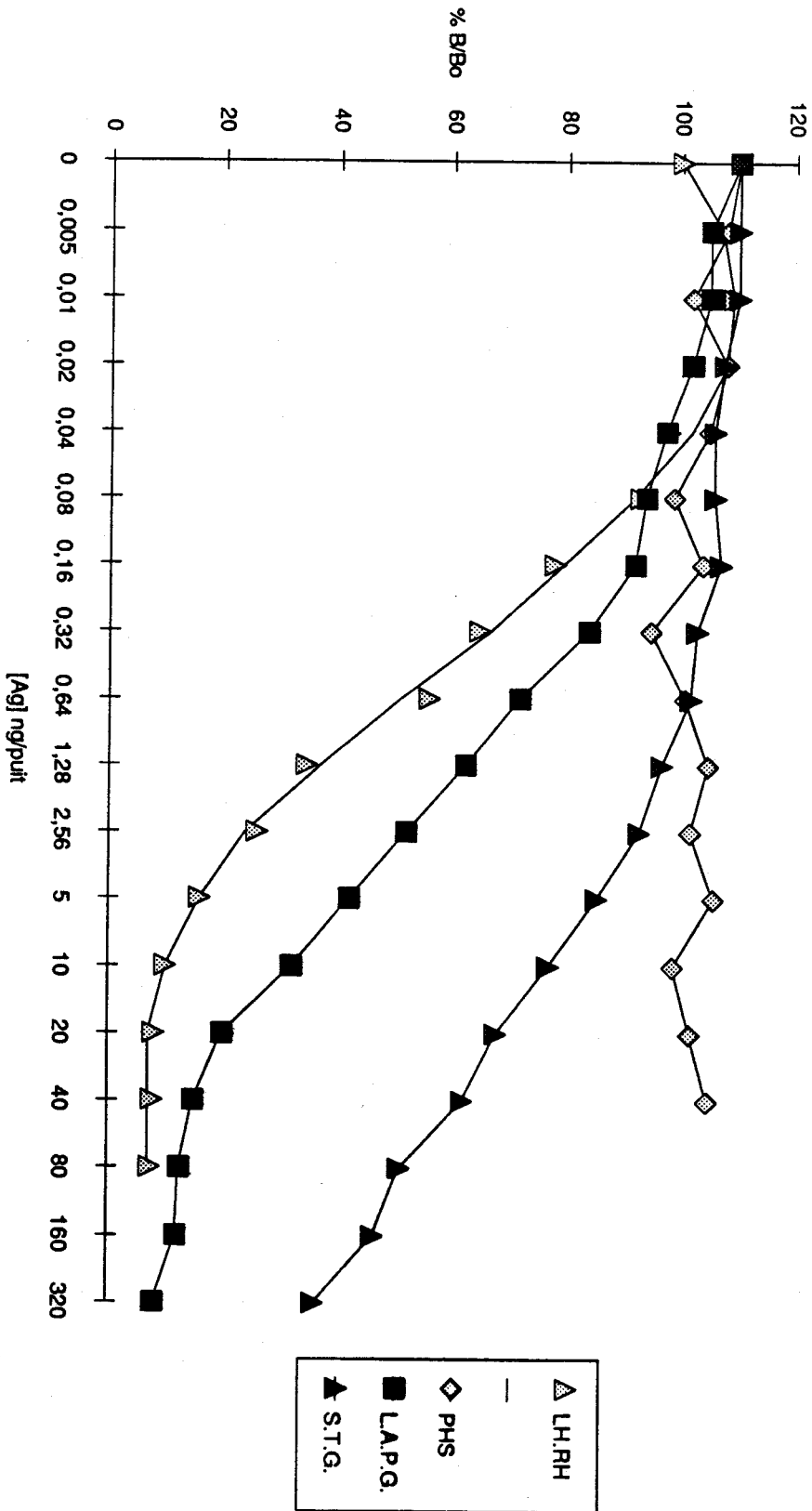
b3 Réaction croisée avec l'Histone (H2A)

Nous avons vérifié si notre anticorps reconnaissait également l'histone H2A soupçonnée, en 1989 par Aten et Coll. d'être la substance gonadique à activité LH-RH like.

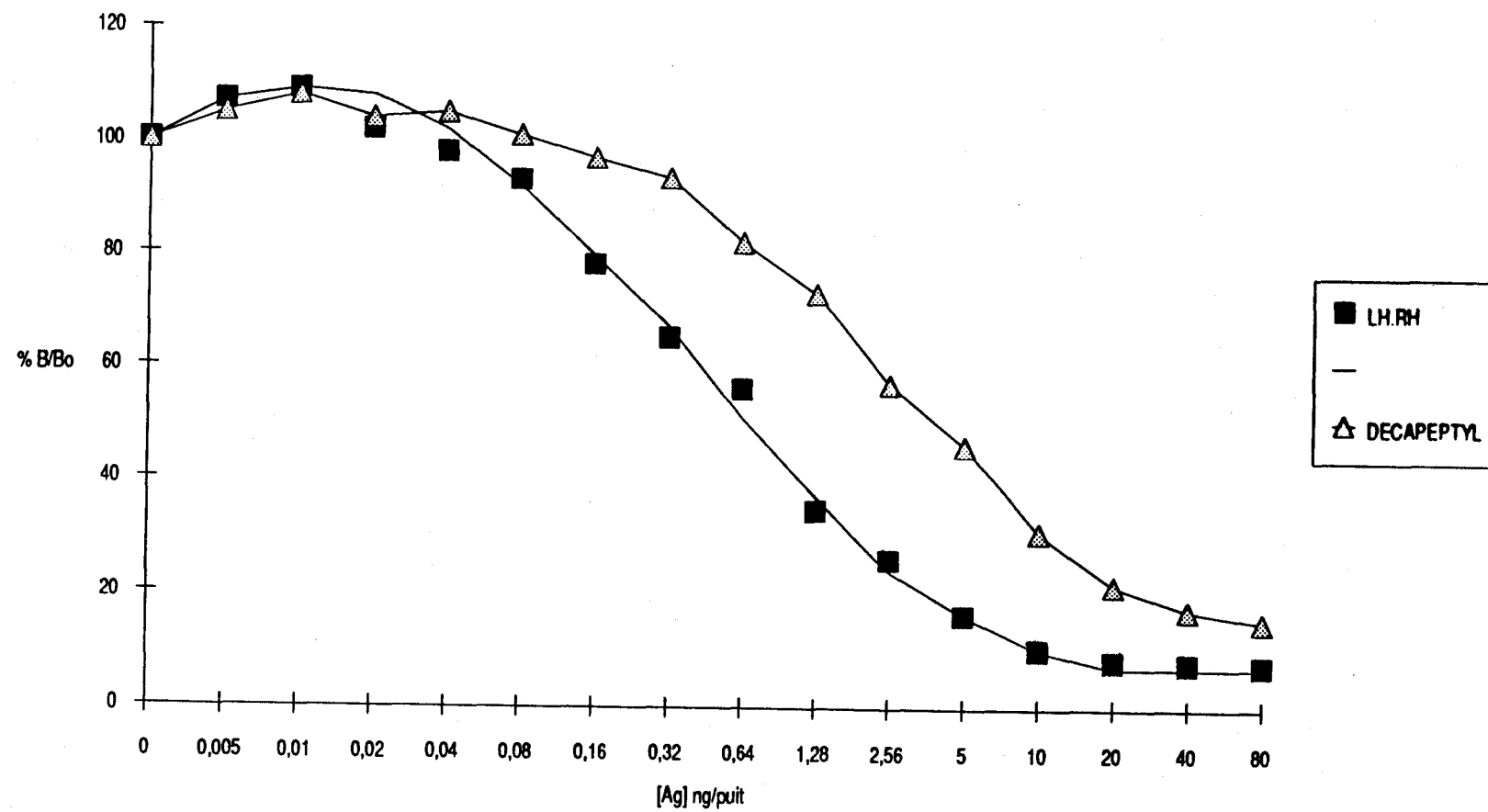
b4 résultats

Les réactions croisées entre le LH-RH synthétique et les différentes substances citées ci-dessus sont étudiées par compétition (Figures 12, 13, 14).

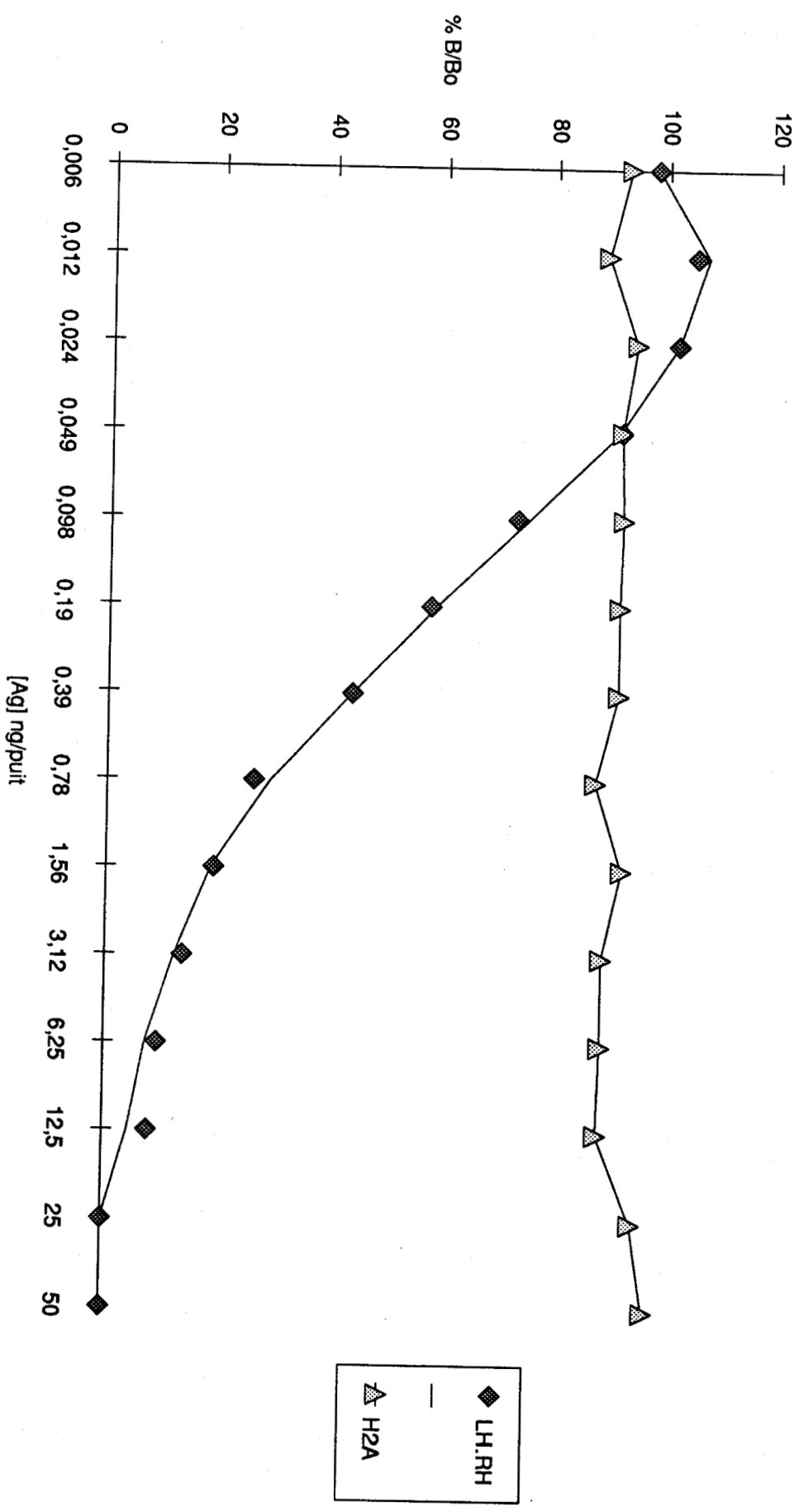
REACTIONS CROISEES AVEC TROIS FRAGMENTS DU L.H.RH



REACTION CROISEE AVEC LE DECAPEPTYL

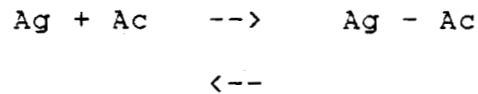


REACTION CROISEE AVEC L'HISTONE H2A



◆ LH, RH
 —
 ▲ H2A

Le calcul des affinités de l'anticorps pour les différents antigènes est :



$$K_D = \frac{(\text{Ag}) \cdot (\text{Ac})}{(\text{Ag} - \text{Ac}) \text{ complexé}}, \text{ lorsque } 50 \% \text{ de l'Ac est}$$

$$K_D = (\text{Ag})$$

1

$$\text{L'affinité est } K_a = \frac{1}{(\text{Ag}) 50\%} \cdot M$$

Les réactions croisées sont évaluées par le rapport entre l'affinité de l'anticorps pour le LH-RH synthétique et son affinité pour la substance à tester. Le résultat est donné en pourcentage (Tableau n° 4).

Notre anticorps ne réagit pas avec le fragment N-terminal (LH-RH 1-3) du LH-RH. Par contre, on observe une réaction croisée de 5.35 % pour le fragment C-terminal (LH-RH 7-10) et une plus faible, 0.54 %, pour le fragment central (LH-RH 4-6).

L'anticorps anti LH-RH semble donc reconnaître la partie C-terminale du LH-RH, de l'acide aminé 4 à 10. On constate que l'affinité de l'anticorps pour le décapeptyl est diminuée. La réaction croisée est de 16.9 %. Ce résultat concorde avec

SPECIFICITE DE L'ANTICORPS ANTI - LH.RH.

Antigènes	% des réactions croisées
LH. RH (1-10)	100 %
[D-Trp ⁶] LH. RH	16,9 %
LH. RH (7-10)	5,35 %
LH. RH. (4-6)	0,54 %
LH. RH. (1-3)	-
H2A	-

le précédent. La modification structurale de l'analogue se situe dans la zone du déterminant antigénique du décapeptide natif.

La courbe d'inhibition de la fixation de l'Ac sur le LH-RH fixé, par des doses croissantes d'histone H2A reste en plateau. Il n'y a pas de reconnaissance immunologique entre notre Ac et l'histone H2A.

c. Précision

Dans le texte et les tableaux ultérieurs, les valeurs sont accompagnées de l'erreur standard de la moyenne :

$$S_m \text{ (S.E.M.)} = \frac{S}{n}$$

où S est l'écart type ou déviation standard et n le nombre de valeurs étudiées. Le S_m doit être inférieur ou égal à 10 % pour que les résultats soient acceptables.

Tous nos tests sont effectués en triplète. S_m s'accroît au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité d'antigène (étalon ou échantillon) ; S_m est fonction de la pente de la courbe standard.

d. Sensibilité

La sensibilité du dosage est définie par la plus petite quantité d'antigène susceptible d'être distinguée de zéro. Nous avons vu que la limite de détection variait en fonction des saignées mais aussi des séries de dosage puisqu'elle dépend :

- de l'affinité de l'anticorps

- de la quantité d'antigène adsorbé et donc de la bonne qualité de l'adsorption.

Pour nos meilleures saignées, nous pouvons détecter 0.09 ng/ml de LH-RH.

e. reproductibilité

e1 Coefficient de variation intra-système (intra-essai)

Il s'effectue par l'insertion de plusieurs dosages pour un même échantillon au cours d'une même série de dosage.

Le coefficient intra-essai se situe entre 7 et 8.5 %

e2 Coefficient de variation inter-système (inter-essai)

Il s'effectue par le traitement d'échantillons connus lors de l'exécution de série de dosages différents.

Le coefficient de variation inter-essai est de 11 à 16 %

f. Exactitude de la méthode

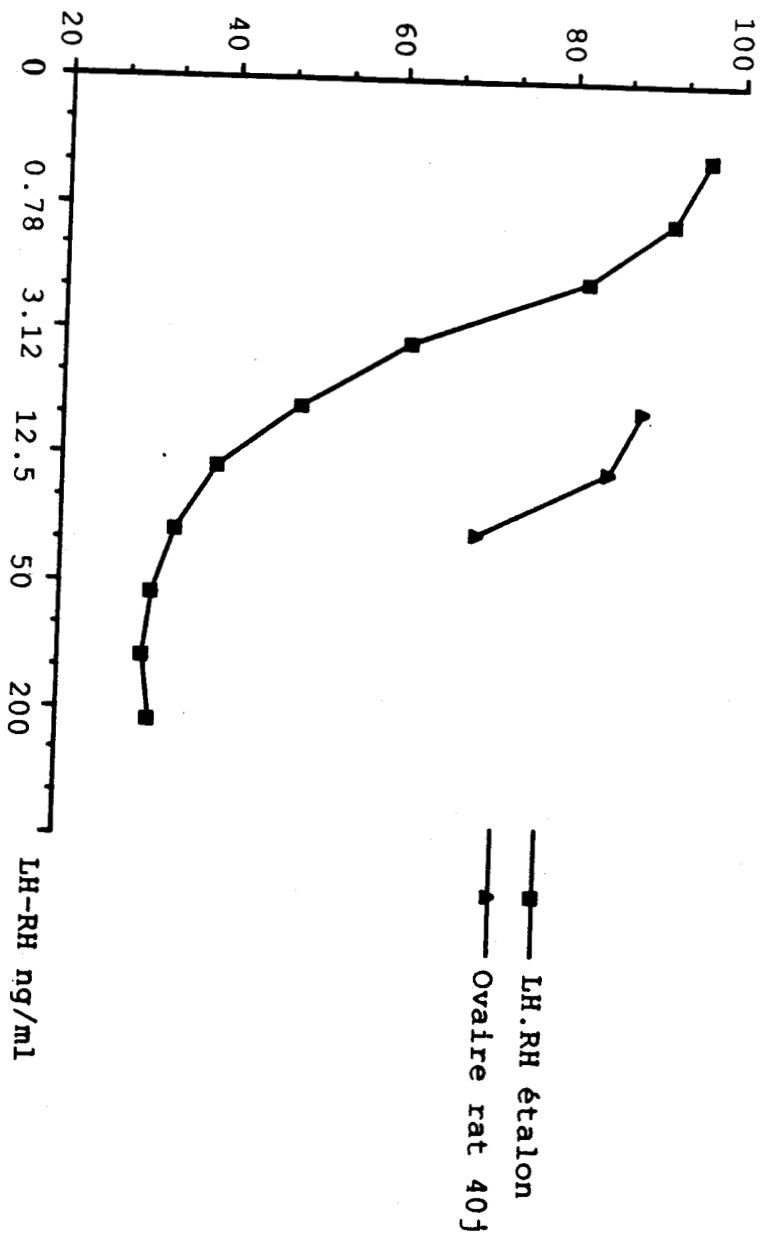
Elle indique l'écart avec lequel les résultats s'éloignent de la valeur "réelle" : cette différence est évaluée en effectuant un test de dilution d'un échantillon riche en antigène, elle permet de vérifier que la forme circulante et celle du standard ont même immunoréactivité ; la courbe obtenue devant être parallèle à la courbe standard.

Nous avons étudié les réactions croisées entre le LH-RH synthétique natif et le LH-RH like gonadique à partir d'extraits ovariens de rat et d'humains et à partir de fluides folliculaires humains provenant de ponctions folliculaires dans le cadre de la FIVET (F. Lecuru, Dr. Saint Pol)

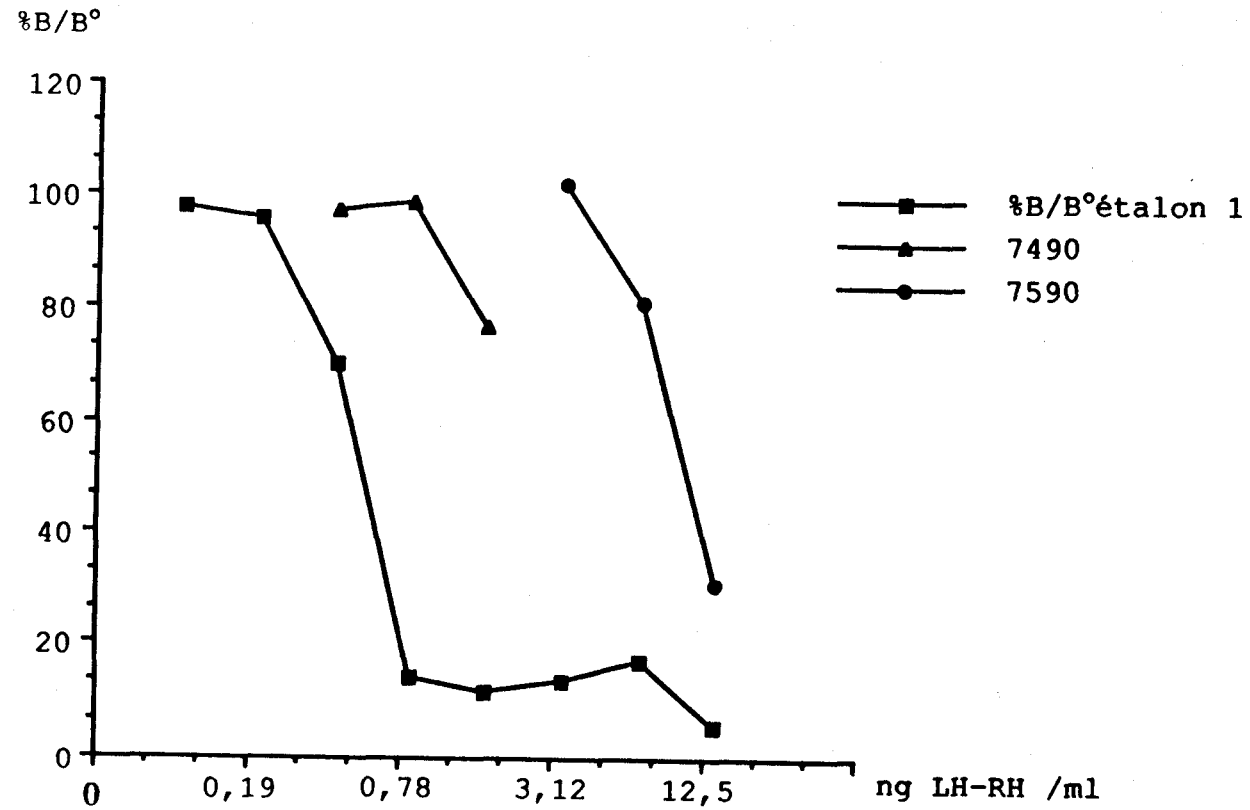
Nous avons utilisé une technique classique d'extraction du LH-RH utilisée à l'origine par Burgus et coll. (1973) pour

%B/B°

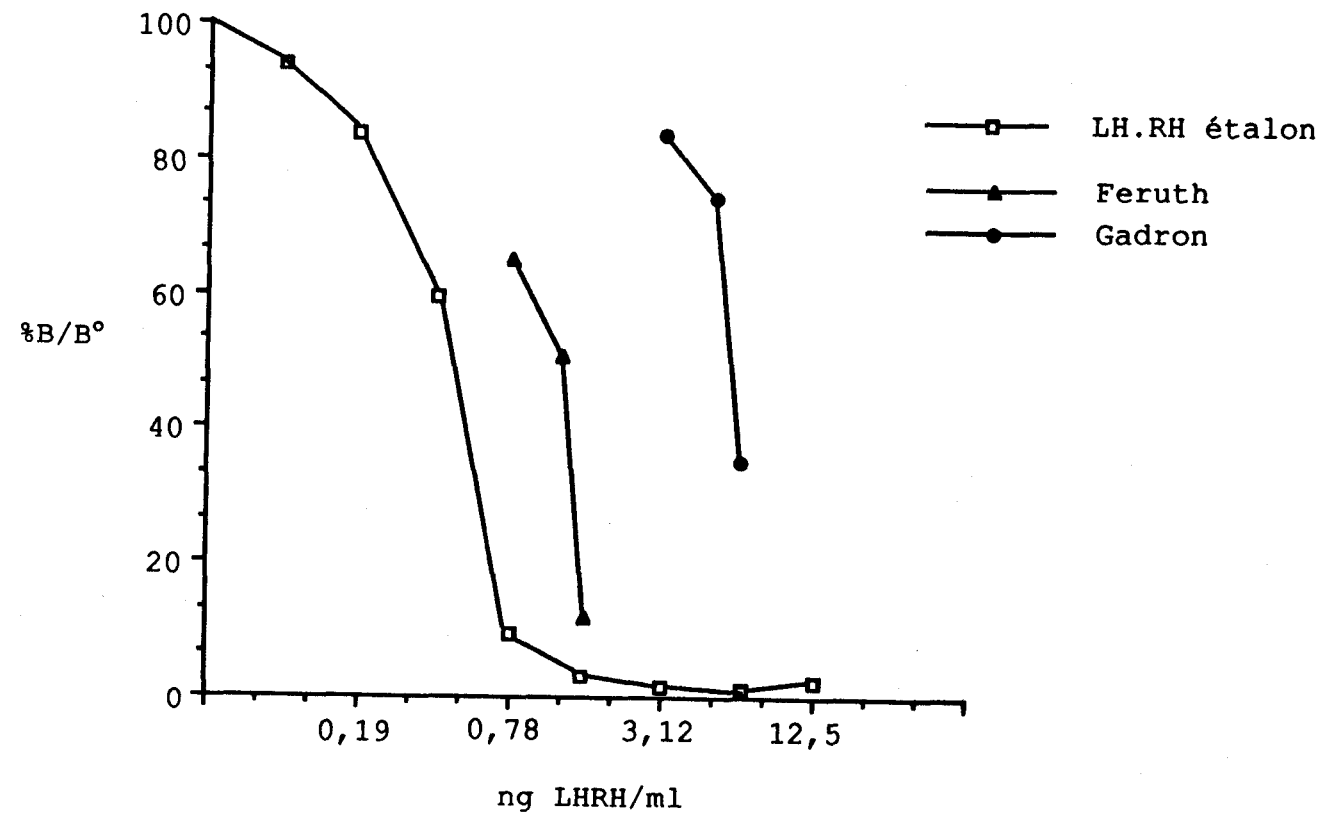
Réaction croisée de l'anticorps anti LH-RH avec des extraits gonadiques de Rat



REACTION CROISEE de l'Anticorps anti-LH-RH
avec des extraits ovariens humains



Reaction croisée de l'anticorps anti LH-RH
avec les fluides folliculaires humains



l'extraction du LH-RH à partir d'hypothalamus d'ovins.

L'addition d'extraits ovariens de rates adultes (40 jours) et d'enfants âgés de 14 jours et 3 ans 1/2 provoque une diminution de la fixation d'anticorps sur l'antigène natif adsorbé. (Figures 15 et 16). La courbe de décroissance observée est parallèle à la courbe étalon de référence. Ceci indique que la réaction croisée entre le LH-RH synthétique et la substance LH-RH like ovarienne est complète. Les résultats de dosages peuvent donc être exprimés en unités pondérales des préparations standards.

La courbe de compétition entre le LH-RH synthétique et les fluides folliculaires humains (Figures 17) est également parallèle à la courbe standard.

Ces résultats mettent en évidence une identité immunologique totale du LH-RH synthétique hypothalamique avec les substances LH-RH like ovariennes de rat et d'humain. Ils révèlent également que le LH-RH like ovarien n'est pas spécifique d'espèce tout comme son homologue hypothalamique.

Enfin, ils démontrent que notre dosage E.L.I.S.A. quantitatif peut être appliqué à l'étude d'échantillons ovariens d'origines diverses (extraits tissulaires, fluides folliculaires) et d'espèces animales différentes

DEUXIEME PARTIE

ESSAI DE CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES
SUBSTANCES LH-RH LIKE OVARIENNES CHEZ LE HAMSTER HYPERSTIMULE

INTRODUCTION

La première hypothèse de l'existence d'une source locale d'un facteur LH-RH like dans l'ovaire a été émise par Ying et coll. en 1981. Un facteur provenant de l'extraction acide de fluides folliculaires et de milieu conditionné de cellules de la granulosa de rat, est capable de reproduire les effets biologiques du LH-RH en provoquant la libération de FSH et de LH à partir de cellules hypophysaires in vitro. Ce facteur semble immunologiquement et chromatographiquement (C18 RP-HPLC) distinct du LH-RH natif. Son poids moléculaire est inférieur à 3500 Da.

Depuis cette date, peu de travaux ont été effectués sur ce sujet. Des substances LH-RH like ont été mises en évidence dans les ovaires de rat (Aten et coll. 1986), de bovins (Ireland et coll. 1988, Aten et coll. 1987a), d'ovins (Aten et coll. 1987b), de porcins (Kling et coll. 1984, Williams et coll. 1983, Jackson et coll. 1989) et dans les ovaires humains (Aten et coll. 1987b, Huang et coll. 1986).

Détection immunologique de facteurs LH-RH like gonadique

La détection des facteurs LH-RH like gonadiques par des sérums anti LH-RH fabriqués à partir de LH-RH hypothalamique a été très controversée dans la littérature.

Les premières tentatives de dosages radioimmunologiques du LH-RH ont été un échec. Les auteurs en ont conclu que le LH-RH ovarien était immunologiquement distinct du LH-RH hypothalamique (Ying et coll. 1981, Aten et coll. 1986,

Ireland et coll. 1987).

Cependant, deux études ont démontré la présence immunohistochimique de substances LH-RH like dans les ovaires de porcins (Jackson et coll. 1989) et dans les ovaires humains (Huang et coll. 1986).

Ces résultats sont contradictoires.

En fait, l'utilisation d'antisera spécifiques de différentes régions du décapeptide synthétique a montré que le LH-RH like gonadique présentait une homologie immunologique en C-terminal avec le peptide hypothalamique (Dutlow et coll. 1981). Aucune réaction croisée entre les deux formes gonadique et hypothalamique n'est révélée par l'utilisation d'un anticorps de spécificité N-terminale (Bhasin et coll. 1983)

La spécificité C-terminale du sérum anti LH-RH semble être l'élément responsable de la détection de LH-RH gonadique par des techniques immunologiques.

Etat des connaissances sur la caractérisation biochimique des substances LH-RH-like

En raison des difficultés pour détecter immunologiquement les facteurs LH-RH like gonadiques, la plupart des auteurs ont préféré l'utilisation d'une technique RRA (Radio Receptor Assay).

Cette technique est basée sur la capacité de l'extrait gonadique à déplacer la fixation de ^{131}I -LH-RH sur les récepteurs membranaires du LH-RH. Cette technique compétitive a permis d'évaluer des taux de substance en équivalent LH-RH

dans les ovaires (Aten et coll. 1986, 1987a, 1987b, Ireland et coll. 1987) de plusieurs espèces animales (Cf Tableau n°4)

TABLEAU N° 4

ORGANES	AUTEURS	TAUX SUBSTANCE EQUIVALENT LH-RH
testicule rat	DUTLOW et coll. 1981	0.139 ng/organe (RIA)
	rat HEDGER et coll. 1985	1.0 pg/organe (RRA)
		3.8-81 pg/g tissu
ovaire	rat ATEN et coll. 1986	0.56 ng/mg de proteine (RRA)
		3.8 ng/g tissu
	bovin ATEN et coll. 1987a	0.5 ng/ μ g DNA (RRA)
	humain ATEN et coll. 1987b	1.5 ng/g tissu 3.0 ng/g tissu (RRA)

Dans tous les cas, les facteurs LH-RH like ovariens et testiculaires semblent chimiquement différents du LH-RH hypothalamique par :

- * une séquence N-terminale différente.

(Dutlow et coll. 1981)

- * un temps de rétention différent en HPLC de polarité de phase inversée (Ying et coll. 1981, Aten et coll. 1986, 1987a, 1987b).

- * sa thermosensibilité (Aten et coll. 1986, 1987a, 1987b) l'activité biologique LH-RH like ovarienne est détruite à 60° C alors que le LH-RH hypothalamique est thermorésistant.

Les études de fractionnement des substances LH-RH like ont révélé une grande hétérogénéité de formes moléculaires en fonction de la gonade étudiée et des techniques de détection utilisées.

Pour Ying et coll. (1981) le facteur LH-RH like ovarien biologiquement actif a un poids moléculaire inférieur à 3 500 Da.

Dans l'ovaire, deux substances capables de se fixer sur les récepteurs au LH-RH ont été décrites et leur poids moléculaire est compris entre 1 000 et 10 000 Da. (Aten et coll. 1986).

Quatre substances immunologiquement apparentées au LH-RH ont été mises en évidence dans le testicule de rat. elles ont un poids moléculaire > 100 000 Da, de 32 000 Da, de 5 000 Da, et ≤ 4 000 Da (Dutlow et coll. 1981). Une étude supplémen-

taire sur extraits acides testiculaires met en évidence la présence de deux formes moléculaires de PM 68 000 Da et 6 000 Da capables de se fixer sur les récepteurs au LH-RH.

Les études de spécificité de notre anticorps anti LH-RH ont montré qu'il était dirigé contre la partie C-terminale du décapeptide. Nous avons donc tenté de caractériser immunologiquement les formes LH-RH like ovariennes à partir d'extraits ovariens de hamster hyperstimulés.

RESULTATS

I. ANIMAUX

La caractérisation d'une substance paracrine a nécessité l'obtention d'un nombre important d'ovaires pour les raisons suivantes :

- la taille du peptide (10 acides aminés pour le LH-RH hypothalamique) le rend très sensible à l'action des protéases intracellulaires et extracellulaires.

- sa demi-vie est estimée à 3-4 minutes.

- étant donné son rôle hypothétique dans les régulations paracrines de la folliculogénèse, son taux dans l'organe est très faible :

ex : chez le rat : 1 pg/testicule (Hedger et Coll. 1986)

3.8 ng/g tissu ovarien

(Aten et Coll. 1986)

Pour la réalisation de ce travail, nous avons obtenu un grand nombre d'ovaires de hamsters. Ces animaux destinés au test de fécondance des spermatozoïdes humains (Laboratoire de Biologie de la Reproduction Pr. J. Léonardelli, et Dr. P.Saint Pol), sont préalablement stimulés pour obtenir une ovulation multiple selon le protocole suivant :

Les animaux sont cyclés par l'examen de frottis vaginaux A J1 du cycle oestral, 35 UI d'hMG (human ménopausic gonadotrophin) sont injectés par voie transpéritonéale aux hamsters Cette étape a pour rôle d'induire un recrutement folliculaire massif. Le nombre élevé de follicules recrutés va permettre d'obtenir une "superovulation".

A J3, une injection de 30 UI d'hCG (human chorionic gonadotrophin) est effectuée en transpéritonéal également. Elle mime l'action du pic préovulatoire de LH. Les animaux sont sacrifiés dans la matinée du J4, jour de l'ovulation, par décapitation. Les ovaires sont prélevés immédiatement après sacrifice, rincés dans du PBS et congelés à - 20° C dans 0.1 N d'HCl jusqu'à extraction.

Trente cinq à quarante cinq ovocytes sont récupérés dans les trompes au lieu de huit à douze dans des conditions physiologiques.

II. RESULTATS EXTRACTION ET DOSAGES

Les résultats de dosages des extraits bruts sont donnés dans le tableau n° 5. Les valeurs de dosages sont rapportées au milligramme de protéines extraites. Cette unité de mesure permet la comparaison des résultats d'un dosage à l'autre.

Les résultats sont reproductibles d'une série à l'autre.

Afin d'étudier la répartition des différentes formes moléculaires des substances LH-RH like ovariennes, les extraits ovariens sont fractionnés séquentiellement par :

- ultrafiltration sur membrane de coupure à 30 000 Da.
- par chromatographie préparative de gel filtration G15

A chaque étape de fractionnement, les échantillons sont dosés en E.L.I.S.A pour déterminer le taux de substances immunoréactives. Le taux d'immunoréactivité au LH-RH (ir LH-RH) est rapporté au taux de protéines totales extraites déterminé préalablement.

Extraction N°	Poids d'un ovaire (mg)	Nombre d'ovaires	Poids de tissus g	Taux de Protéine ng/ml	ir LH.RH. total ng	ir LH.RH. ng/mg prot
1	21	180	3.80	1.2	5.8	4.83±0.43
2	19.80	21	0.416	0.175	0.9	5.14±0.57
3	21.40	111	2.38	2.5	18.9	5.25±0.90

Ce protocole nous a permis d'obtenir une répartition des substances immunoréactives par zone de poids moléculaire.

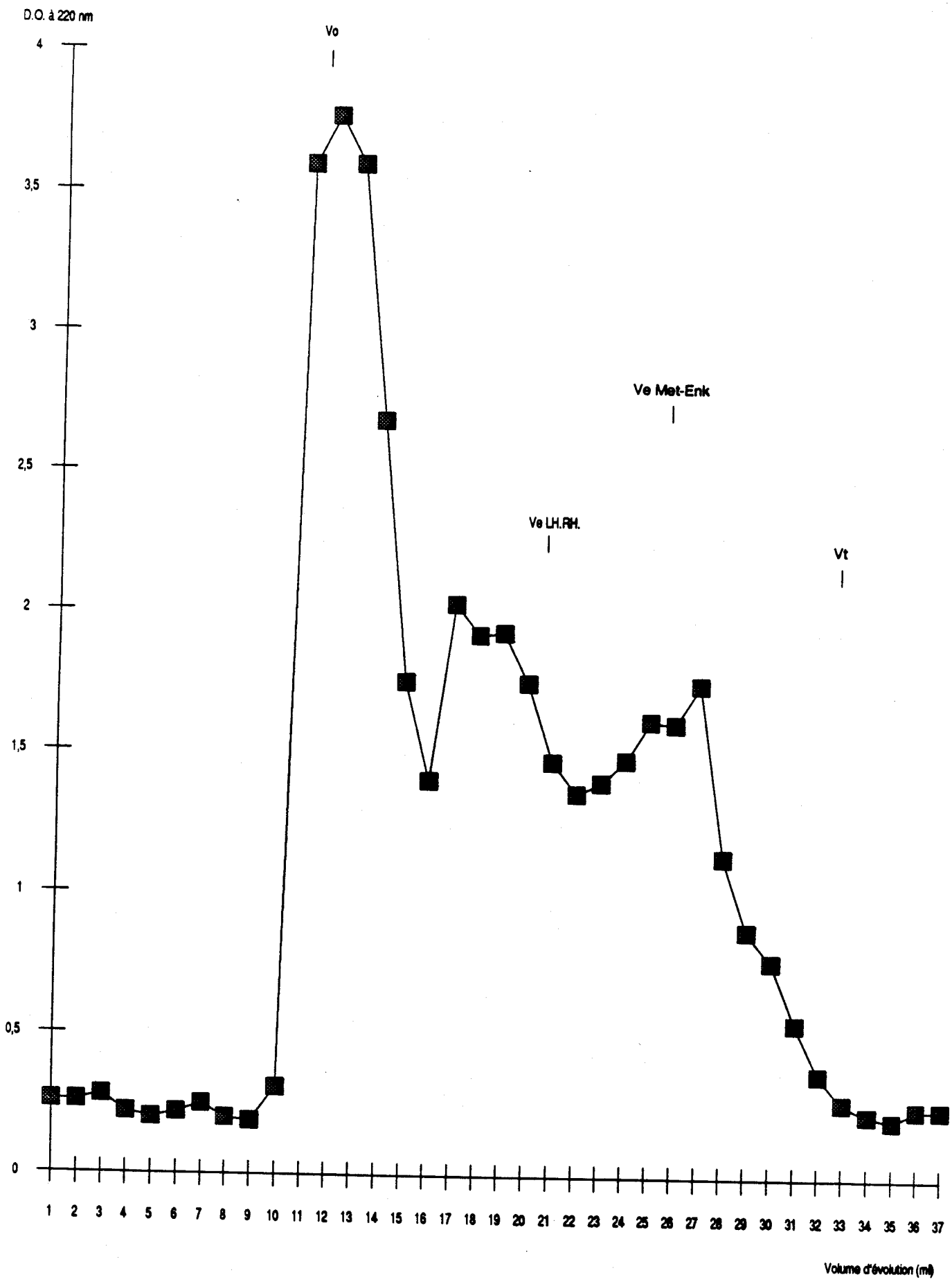
Les échantillons ovariens sont passés sur colonne de Gel filtration G15 dont la zone de fractionnement s'étend de 0 à 1500 Da. Nous rappelons que le poids moléculaire du LH-RH natif est de 1182.5 Da. La figure 18 représente le profil chromatographique d'élution des échantillons ovariens.

Nous avons divisé en plusieurs fractions les pics d'élutions :

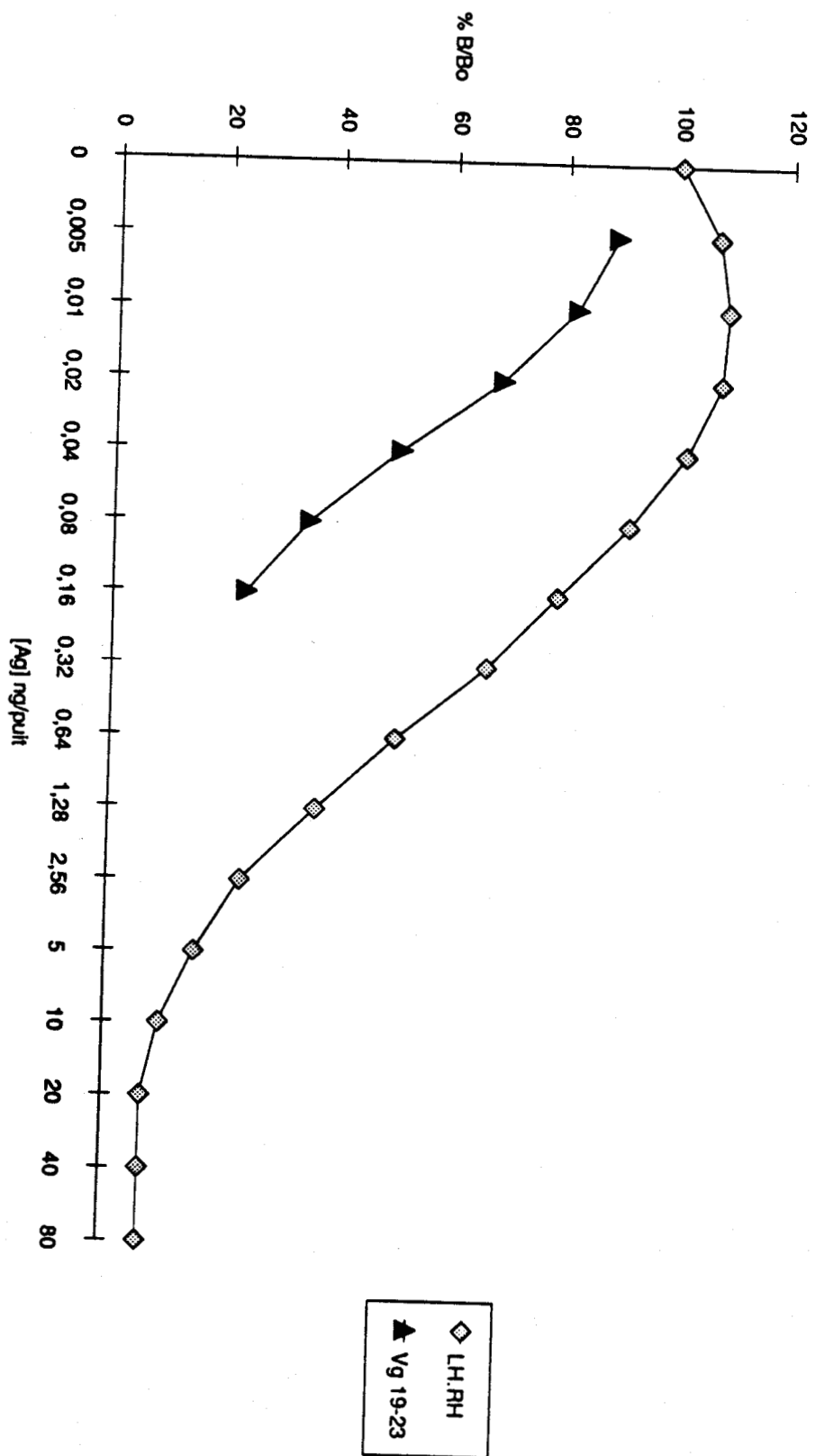
- 1 fraction contenant le volume mort : 10 - 14.
- 4 fractions correspondant aux substances retenues dans le gel
 - 15-18
 - 19-23 (volume d'élution du LH-RH synthétique)
 - 24-27 (volume d'élution de la Met-Enk)
 - 28-31 (volume total : volume d'élution du bichromate de sodium)

Chaque pool est lyophilisé et dosé en E.L.I.S.A. Deux fractions présentent une immunoréactivité au LH-RH : la fraction 10-14 correspondant à des substances de PM > 1500 Da et la fraction 19-23 correspondant au volume d'élution du LH-RH synthétique. Les dosages sont effectués en série de dilution. La courbe d'inhibition de fixation des anticorps anti LH-RH obtenue pour chacune des fractions est parallèle à la courbe standard (fig. 19).

CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION G15 DE L'EXTRAIT OVARIEN BRUT



INHIBITION DE LA FIXATION Ag - Ac PAR L'EXTRAIT OVARIEN Vg 19 - 23



REPARTITION DE L'ir LH.RH EN FONCTION DES POIDS MOLECULAIRES

	TOTAL ir LH. RH ng/mg protéine	ir LH.RH.<30000 Da ng/mg protéine	ir LH.RH.>1500 Da ng/mg protéine	ir LH.RH<1500 Da ng/mg protéine	Pic HPLC
Moyenne sur 3 essais	5,07 ng ± 0,21	4,88 ± 0,32	1,856 ± 0,09	2,73 ± 0,13	2,45 ± 0,28

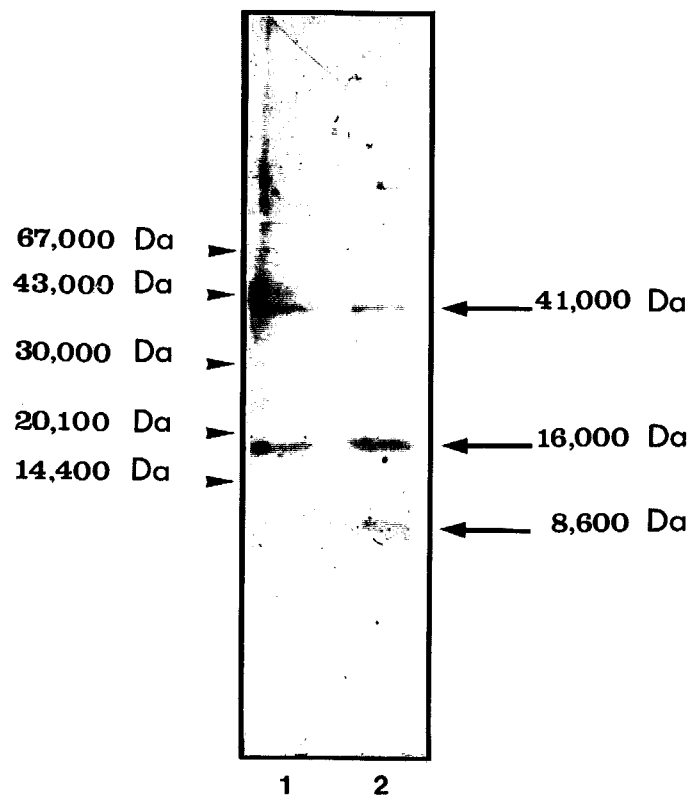
Les taux obtenus après fractionnement sont notés dans le tableau n° 6. On constate que 56 % de l'immunoréactivité correspond à une ou plusieurs substances de PM < 1500 Da et 44 % se répartit au delà de ce poids moléculaire.

On note une perte d'immunoréactivité de l'ordre de 10 % ce qui correspond à un rendement de 90 % pour cette technique

Lorsque l'extrait brut est fractionné par ultrafiltration sur membrane de coupure à 30 000 Da le taux d'ir-LH-RH du filtrat n'est pas significativement différent du taux de départ. Ce résultat suggère que les substances immunoréactives au LH-RH ont un poids moléculaire compris entre 0 et 30 000 Da.

Pour caractériser plus précisément ces substances, les fractions (Vo, 19-23) immunoréactives sont soumises à deux expérimentations différentes :

1. La fraction de "haut PM" est soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS. L'électrophorèse est suivie d'un transfert sur feuille de nitrocellulose et les substances immunoréactives sont révélées par immunoblotting. Les résultats du Western Blot (Figure n° 20) montrent la présence de trois substances immunoréactives de poids moléculaires estimés à 41 000 Da, 16 000 Da, et 8 600 Da. La révélation immunologique est significative lorsqu'on la compare à la réaction développée par la substitution de l'antisérum spécifique par le sérum non immun du lapin ayant servi à l'immunisation. La dernière bande immunoréactive correspond à un petit poids moléculaire sortant de la gamme



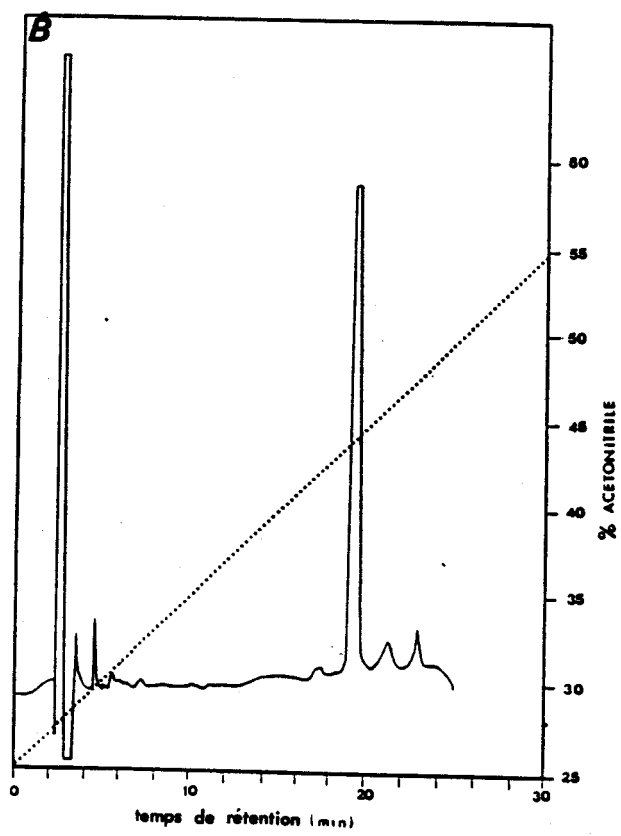
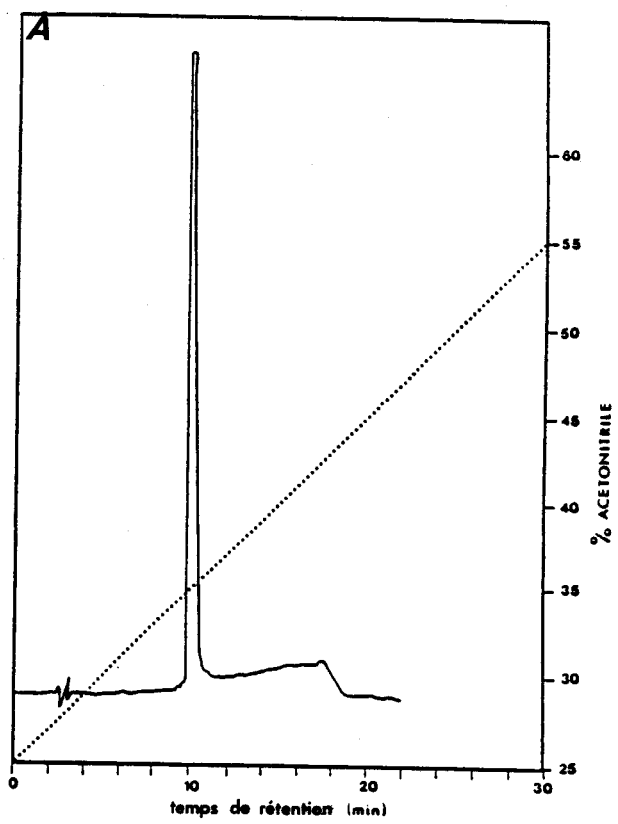
étalon utilisée dans l'expérience. L'extrapolation de la courbe de référence nous a permis de définir approximativement le poids moléculaire de cette substance comme étant de 8 600 Da.

La forme immunoréactive de poids moléculaire avoisinant 41 000 Da ne semble pas être détectée en dosage E.L.I.S.A. : les taux d'ir LH-RH de l'extrait brut et de l'extrait ultrafiltré ne sont pas significativement différents.

2. La fraction de PM < 1500 Da ne peut être exploitée de la même façon en raison du faible PM qui rend difficile sa détection en Western Blot. Une technique d'HPLC en phase inverse (colonne C18 μ Bondapak) est utilisée.

Lorsque l'échantillon 19-23 de gel filtration est fractionné, on observe l'élution d'un pic unique à 44 % du gradient, (Figure n° 21). Le LH-RH étalon a un temps de rétention plus court, il est élué à 35 % du gradient. Le pic HPLC de l'échantillon est récupéré en totalité, lyophilisé et dosé en E.L.I.S.A. Les résultats montrent qu'il contient effectivement une (ou des) substances immunoréactives. Le taux obtenu est proche de celui obtenu avant HPLC (Tableau n° 6).

La substance immunoréactive de PM < 1500 Da n'a pas le même profil chromatographique en HPLC de polarité de phase inversée que le LH-RH natif. Le LH-RH like ovarien est donc chimiquement différent du LH-RH natif. Les modifications chimiques du LH-RH like ovarien peuvent être quantitatives (augmentation du nombre d'acides aminés) comme cela a été soupçonné par Dutlow et coll. (1981) et / ou qualitatives



(substitution d'acides aminés, modification par des groupements chimiques). La substance ovarienne est plus hydrophobe que le LH-RH hypothalamique dans notre expérimentation comme dans la littérature (Aten et coll. 1986, 1987a et b, Ireland et coll. 1988).

DISCUSSION

A l'aide de l'anticorps utilisé, dans notre étude, nous obtenons une réaction croisée totale entre le LH-RH ovarien de hamster et le LH-RH hypothalamique. Les résultats de dosage de l'extrait brut d'ovaires de hamster hyperstimulés montrent que le taux de substance LH-RH-like est supérieur à celui retrouvé chez le rat stimulé par d'autres auteurs (Aten et coll. 1986).

Le fractionnement de l'extrait ovarien révèle l'existence de plusieurs formes moléculaires immunoréactives. Trois substances de haut poids moléculaires ont été mises en évidence par une technique de Western-Blotting. Les deux formes immunoréactives de masse moléculaire estimée à 16.000 Da et 8.600 Da pourraient correspondre à différents précurseurs du LH-RH lorsqu'on les compare aux précurseurs hypothalamiques connus (Hedger et coll. 1985, Valenca et coll. 1988).

Comme la plupart des neuropeptides, le LH-RH est synthétisé sous forme de pré-prohormone contenant à son extrémité N-terminale, une séquence hydrophobe appelée "peptide signal". La séquence des peptides actifs est généralement entourée de paires d'acides aminés basiques site d'action des enzymes responsables du clivage du précurseur.

Le précurseur du LH-RH est une "prohormone" de 69 acides aminés de poids moléculaire d'environ 8.300 Da. Il est constitué du GAP, GnRH associated Peptide et du décapeptide à son extrémité N-terminale.

Nikolics et coll. (1989) ont récemment rapporté la présence dans le tissu placentaire et dans l'hypothalamus humain d'une protéine immunoréactive au LH-RH de poids moléculaire 16.000 Da. Ces deux formes de précurseurs, dans l'hypothalamus et le placenta, possèdent des déterminants antigéniques commun avec le LH-RH (Hedger 1985, Valenca 1988).

Une des hypothèses avancées pour la forme de 16 000 Da est la dimérisation de la prohormone par deux résidus cystéine formant un pont disulfure (Nicolics et coll. 1989).

Les conditions opératoires de notre électrophorèse incluent un traitement par le β mercaptoethanol des échantillons ovariens. Nos résultats en Western-Blot montrent que la forme ir LH-RH de 16.000 Da est présente dans ces conditions. Il ne s'agit donc vraisemblablement pas d'une forme dimérisée (par deux ponts disulfures) de la prohormone.

L'hétérogénéité des produits obtenus après clivage des précurseurs protéiques dans différents tissus est connue. Elle pourrait résulter de l'existence de plusieurs systèmes enzymatiques impliqués dans la maturation des précurseurs. D'autre part, bien qu'il n'existe qu'un gène unique codant pour le LH-RH, on soupçonne l'existence d'un épissage tissu spécifique du même hn-mRNA. En l'occurrence, dans le placenta humain, le premier intron du gène du LH-RH n'est pas excisé (Seeburg et coll. 1984, Adelman et coll. 1986) contrairement au gène hypothalamique.

Plus récemment, les ARNm du LH-RH ont été localisés dans les cellules de la granulosa de l'ovaire de rat (Sakakibara

1989). L'ARNm ovarien est plus long (700b) que celui du LH-RH hypothalamique (500 b).

Tous ces résultats sont en faveur d'un épissage tissu-spécifique des ARNm du LH-RH. La séquence codant pour le LH-RH est localisée près du premier intron. Ceci pourrait expliquer l'hypothétique modification N-terminale du LH-RH gonadique. Plusieurs études, dont la notre, indiquent en effet que toutes les formes immunoréactives testiculaires et ovariennes du LH-RH présentent des homologues immunologiques centrale et C-terminale mais différent en N-terminal (Dutlow et coll. 1981, Aten et coll. 1986, Bhasin et coll. 1981).

La présence d'une forme moléculaire immunoréactive de PM 41 000 Da est originale. Ce résultat n'a pas été retrouvé dans la littérature. Bhasin rapporte la présence d'une protéine (ou glycoprotéine) de PM 66 000 Da ayant une activité RRA. Dutlow et coll. (1981) ont démontré, dans le testicule, la présence de quatre substances immunoréactives de PM < 4000 Da, PM \approx 5000 Da, PM \approx 32 000 Da et PM > 100 000 Da. Le poids moléculaire de ces protéines immunoréactives ou ayant une activité RRA est variable selon les auteurs. Notre étude confirme cette hétérogénéité.

Comme dans la littérature, le LH-RH like ovarien ne présente pas le même profil chromatographique que le LH-RH natif lorsqu'il est fractionné en HPLC de polarité de phase inversée. La substance gonadique est plus hydrophobe. Cependant, son poids moléculaire est voisin du poids moléculaire du LH-RH hypothalamique.

Dans un proche avenir, nous envisageons d'étudier l'activité RRA des différentes formes moléculaires obtenues après électrophorèse et notamment de la forme immunoréactive de 41 000 Da.

Une étude de caractérisation, d'isolement et de séquençage de la substance immunoréactive de poids moléculaire inférieur à 1500 Da est en cours au laboratoire.



TROISIEME PARTIE

ETUDE ONTOGENIQUE DES SUBSTANCES LH-RH LIKE OVARIENNES

CHEZ LE RAT

INTRODUCTION

Le développement de l'ovaire en période prépubaire est dû au recrutement et à la croissance des follicules.

La croissance folliculaire est stimulée d'une manière variable par les gonadotrophines. La sensibilité des follicules à l'action stimulante de FSH varie en fonction de leur stade de maturation (Gougeon 1986, Renard et André 1984).

La folliculogénèse peut être divisée en trois phases en fonction de la sensibilité aux gonadotrophines :

- L'initiation de la croissance folliculaire (du stade follicule primordial au stade follicule secondaire ou pré-antral).

Cette phase est indépendante des gonadotrophines puisqu'elle se maintient après hypophysectomie. Les facteurs impliqués dans la sortie du stock quiescent sont inconnus. Cependant, l'injection de FSH présente une action favorisante sur l'initiation de la folliculogénèse.

- La croissance folliculaire tonique (du follicule pré-antral au follicule antral de petite taille).

La croissance des follicules a lieu normalement en présence de faibles taux circulants de FSH/LH.

L'hypophysectomie est sans effet sur ce développement. Ces follicules n'atteignent jamais le stade préovulatoire en absence de gonadotrophines.

- La croissance folliculaire régulée (chez l'adulte uniquement) du petit follicule antral au follicule préovulatoire

C'est à ce stade précis de la folliculogénèse que le follicule est le plus sensible aux variations du taux de FSH/LH. Des vagues de croissance et d'atrésie folliculaire caractérisent cette période qui aboutit à la sélection et à la maturation du ou des follicules ovulatoires. FSH est indispensable à la sélection des follicules qui deviendront ovulatoires.

La croissance résulte tout d'abord de la multiplication des cellules de la granulosa. Cette action est induite par la fixation de FSH sur un récepteur membranaire présent très précocément sur les cellules. L'action intracellulaire de cette hormone est médiée par l'AMPc. Elle favorise la synthèse d'aromatase qui convertit les androgènes en oestrogènes. Les oestrogènes agissent en synergie avec FSH. FSH stimule également la synthèse de ses propres récepteurs augmentant ainsi la sensibilité du follicule à sa propre action.

Outre son rôle sur la prolifération cellulaire, FSH favorise la formation de la cavité antrale et permet l'apparition de récepteurs à LH sur les cellules de la granulosa. FSH induit ainsi la différenciation des cellules de la granulosa qui deviennent progressivement sensibles à LH.

Par ailleurs, la thèque interne s'est différenciée en périphérie du follicule (stade préantral) et ses cellules

grâce à des récepteurs à LH, assurent la production d'androgènes

La FSH est le facteur anti atrétique essentiel. D'un point de vue morphologique, l'atrésie est caractérisée par l'arrêt des mitoses, et par la pycnose des cellules de la granulosa qui débute dans les cellules juxtaposées à la corona radiata (première couche de cellules de la granulosa périovocytaires) pour les follicules secondaires et dans les cellules bordant la cavité antrale pour les follicules tertiaires. L'autre élément caractéristique de l'atrésie folliculaire est la reprise de méiose de l'ovocyte (pseudomaturation) et sa dégénérescence. Les cellules de la granulosa sont phagocytées alors que les cellules de la thèque interne se dispersent dans le stroma avoisinant pour former des amas de cellules interstitielles.

Ce qui détermine l'avenir d'un follicule vers l'atrésie ou la maturation est une balance physiologique qui résulte des effets conjugués des gonadotrophines, des stéroïdes ovariens et des facteurs paracrines (Ledwitz-Rigby 1987).

Le nombre de récepteurs à FSH présents sur la granulosa est primordial. Le rapport androgènes / oestrogènes résultant de la production thécale et de l'aromatation par la granulosa semble un élément déterminant pour l'avenir du follicule (Hillier 1987).

Dans les follicules atrétiques ce rapport augmente, suggérant ainsi un rôle important de l'aromatase dans le processus de trophicité du follicule. Ainsi, toute substance qui

inhibe ou modère de façon directe ou indirecte l'activité d'aromatisation de la cellule de la granulosa, intervient dans le processus d'atrésie folliculaire. Croissance et atrésie sont deux évènements constants de l'activité ovarienne. L'avenir d'un follicule résulte d'un équilibre entre des stimuli inhibiteurs et stimulateurs locaux ou hormonaux (Dizerega et coll. 1987).

L'ovaire impubère est un modèle intéressant pour l'étude de la croissance folliculaire précoce, puisque seuls les stades folliculaires préantraux existent chez le rat de la naissance à 10 jours. Pendant la période juvénile (12 à 25 jours) de nombreux follicules ont évolué jusqu'au stade tertiaire, mais aucun n'atteindra le stade préovulatoire.

Nous avons utilisé ce modèle physiologique pour étudier l'ontogénèse des substances LH-RH like ovariennes. Nous avons associé une étude immunohistochimique de détection du LH-RH like à une étude quantitative immunoenzymologique du peptide sur extraits ovariens.

L'interprétation commune des résultats nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle physiologique du LH-RH-like ovarien dans le contrôle de la croissance folliculaire de l'ovaire immature de rat.

RESULTATS

I. DOSAGE E.L.I.S.A. DU LH-RH SUR EXTRAITS OVARIENS DE RAT

Des rates d'âge croissant sont sacrifiées par décapitation le jour de leur naissance, J0, puis à J5, J10, J15, J20 et J40. Les ovaires sont prélevés, pesés et congelés à -20°C jusqu'à extraction (technique de Burgus et coll. 1979). Cinquante μl de chaque surnageant d'extraction sont prélevés afin d'en déterminer le contenu protéique (système Bio-Rad). Puis chaque échantillon est dosé en E.L.I.S.A : les dosages (en triplète) ont été effectués à trois reprises au moins. Les résultats sont donnés dans le tableau n° 7 : le rendement d'extraction pour chaque série d'animaux est comparable (colonne "protéines extraites"). L'immunoréactivité au LH-RH (ir LH-RH) est rapportée au mg de protéine, au mg de tissu et par ovaire.

Le degré de signification des variations constatées au cours du temps est calculé par le test F de l'analyse de la variance à un facteur contrôlé. Cette étude permet de mettre en évidence une différence significative du taux d'ir LH-RH en fonction de l'âge de l'animal ($p < 0,001$). Les taux observés de J0 à J15 sont relativement importants par rapport au taux de l'ovaire adulte (40J). La quantité d'ir LH-RH déterminée chez l'animal adulte cyclique est similaire à celle rapportée par Aten et coll (1986).

Ces résultats permettent de mettre en évidence deux phases de croissance, chez le rat, caractérisées par de

poids d'un ovaire (mg)	âge des animaux (jour)	nombre d'ovaires	poids de tissus (g)	total des proteines extraites (mg)	protéines extaites (mg/g de tissus)	total ir-LH RH (ng)	ir-LH RH		
							ng/mg de protéines	ng/mg de tissus	ng/ovaire
1,60	0	15	0,0240	0,300	12,50	3,90	13,00	0,16	0,25
2,80	5	5	0,0140	0,236	16,85	3,40	14,40	0,24	0,68
2,34	10	5	0,0117	0,247	21,11	3,40	13,76	0,29	0,68
10,84	15	5	0,0542	0,826	15,25	2,40	2,90	0,044	0,48
8,71	20	14	0,1220	1,828	14,95	3,00	1,64	0,024	0,21
46,50	40	14	0,6510	10,500	16,13	6,30	0,60	0,0097	0,45
55,00	120	8	0,4420	/	/	HD	/	/	/

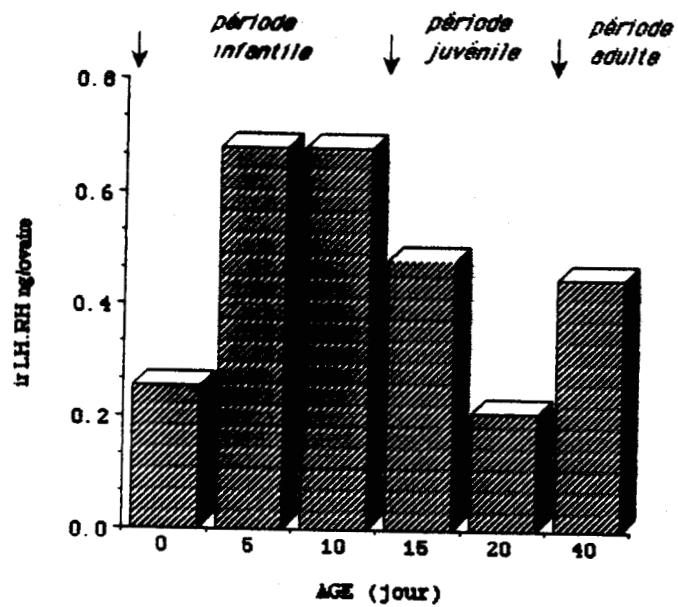
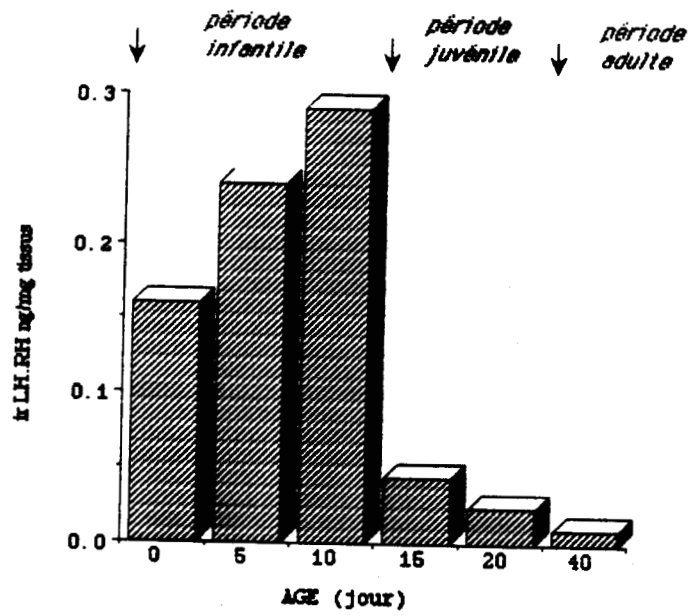
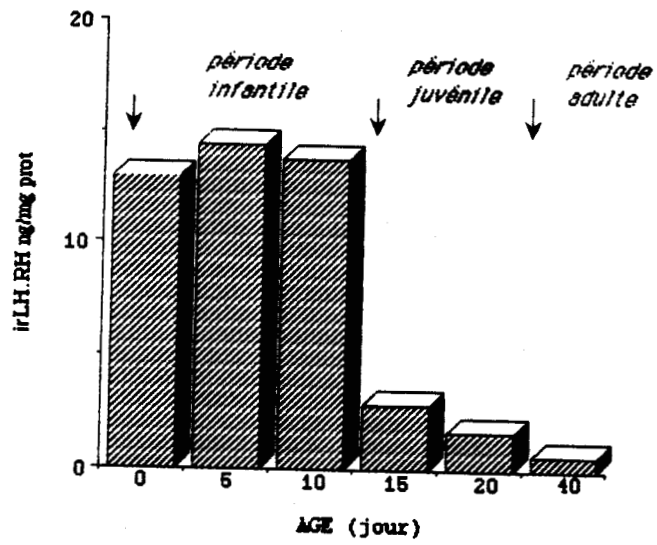
fortes variations de l'ir LH-RH.

1°/ Période infantile (J0 à J10)

Cette période est caractérisée par l'observation des taux d'ir LH-RH les plus importants. Lorsqu'on analyse ces résultats (Figure n°22), on observe, au sein de ce sous-groupe, une variation de l'ir LH-RH différente selon le mode d'expression des résultats : le taux d'ir LH-RH par mg de protéine est 20 fois supérieur à celui observé chez les rates adultes et varie très peu. Par contre, les résultats exprimés en ng / mg de tissu révèlent une progression constante de l'ir LH-RH du jour de la naissance à J10 où elle est maximum. Si la proportion de substances LH-RH like parmi les protéines totales ne varie pas de 0 à 10 jours alors que le poids ovarien subit une progression, on peut supposer qu'il y ait une synthèse de substances LH-RH like et que cette synthèse suive la croissance ovarienne. Cette interprétation est confirmée par l'existence d'un taux d'ir LH-RH global plus important dans les ovaires de 5 et 10 jours que dans les ovaires de nouveau-nés.

2°/ Période juvénile (J15, J20) et adulte (J40)

A partir de J15, une diminution conséquente de l'ir LH-RH est observée quelque soit l'unité de mesure utilisée. Cette chute est concomittante d'une rapide augmentation du poids ovarien entre 10 et 15 jours (Figure n° 22). Elle se poursuit graduellement jusqu'à 20 jours mais de façon moins prononcée. Cette chute pourrait refléter une réelle perte de matériel immunoréactif par diminution de synthèse.



A moins que la croissance ovarienne, importante pendant cette période, n'inclue pas les structures contenant la substance à doser.

A 40 jours, le taux d'ir LH-RH a encore diminué, sauf quand on considère son taux global par ovaire. Il faut noter que les rates adultes utilisées pour cet échantillonnage n'ont pas été cyclées. Le "pool" d'ovaires à J40 est donc constitué d'organes à différents stades du cycle oestral. Les résultats de ce dosage doivent être considérés comme représentant le taux ovarien moyen des femelles cycliques.

En conclusion, on observe chez l'animal impubère, la présence de taux élevés de substances LH-RH like. L'étude de leur variation en fonction de l'âge permet de distinguer deux périodes de production différente : la période infantile caractérisée par de très forts taux d'ir LH-RH et la période juvénile associée à une diminution significative de l'immuno-réactivité.

II. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

1°/ Immunoréactivité cytoplasmique des ovocytes

Quelque soit l'âge de l'animal, une immunoréactivité importante est observée dans le cytoplasme des ovocytes de follicules primordiaux, primaires et secondaires. Ce marquage est complètement éteint lorsque l'antiserum est pré-incubé avec 2.5 mg d'antigène synthétique par ml de sérum pur (planche n° 1). Il s'agit donc d'un marquage spécifique. Les ovocytes dégénératifs (ayant repris leur maturation méio-

tique) et les ovocytes de grands follicules cavitaires ne sont pas immunoréactifs.

De J0 à J10, les ovaires sont uniquement constitués de follicules préantraux : à J0 et J5, de nombreux follicules primordiaux et primaires sont répartis sur toute la surface de l'ovaire. Les ovocytes sont tous marqués par l'anticorps anti LH-RH (planche n° 2 et n° 3). Dix jours après la naissance, la croissance folliculaire a abouti à la formation de nombreux follicules secondaires. Les follicules primordiaux et primaires sont repoussés à la périphérie. Le marquage des ovocytes est constant (planche n° 4).

C'est à partir de J15 que l'on observe la présence de petits follicules antraux (cavité naissante) puis à 20 jours les premiers follicules tertiaires de taille conséquente. Le pool d'ovocytes de follicules primordiaux, primaires et secondaires présente toujours une forte immunoréactivité (planche n°5) et ceci est également observé à l'âge adulte.

2°/ Immunoréactivité des cellules de la granulosa

Des images de marquage cytoplasmique des cellules de la granulosa sont observées dans certains follicules parmi la population globale ovarienne (planche n° 6, 7). Nous n'avons détecté cette immunoréactivité que dans les follicules préantraux. A aucun moment le marquage n'est retrouvé dans l'ensemble des cellules du follicule.

Ce résultat révèle, au sein de la population folliculaire, une hétérogénéité de marquage parmi les follicules de stade de croissance morphologiquement équivalent.

L'immunoréactivité de certaines cellules de la granulosa dans le follicule confirme également l'asynchronisme fonctionnel des populations cellulaires qui aboutit à la différenciation de trois types cellulaires distincts dans le follicule préovulatoire : les cellules de la granulosa murales, les cellules du cumulus oophorus et les cellules de la corona radiata. Leur devenir est différent, puisque les cellules "murales" vont constituer les cellules progestagènes du corps jaune, alors que le complexe cumulus oophorus et corona radiata est expulsé dans les trompes au moment de l'ovulation. Très rapidement, au sein du follicule, ces cellules acquièrent des capacités stéroïdogènes différentes.

Nous noterons que l'immunoréactivité des cellules de la granulosa n'a été observée que sur les coupes d'ovaires de rats âgés de 10 jours et plus, lorsque coexistent, dans l'ovaire, des follicules à différents stades de croissance.

3°/ Immunoréactivité de la lignée théco-interstitielle

A partir de J10, et tout au long de la vie reproductrice du rat, les cellules interstitielles secondaires apparaissent. Elles dérivent de l'atrésie des cellules thécales des follicules involutifs. Ces cellules sont marquées par notre Ac. Le marquage ne varie pas quelque soit l'âge de l'animal. Par contre, aucun marquage visible n'est observé dans les cellules de la thèque interne quelque soit le stade de différenciation folliculaire.

4°/ Immunoréactivité après culture

Afin de vérifier l'origine endogène des substances immunoréactives au LH-RH trouvées dans les ovocytes, la granulosa et le tissu interstitiel, des ovaires de rates âgées de 20 jours sont prélevés et mis en culture organotypique : la survie s'effectue pendant 24 heures sans addition d'hormones exogènes. Les ovaires sont coupés en morceaux et déposés sur une feuille de nitrocellulose affleurant le milieu de culture (HAM'F, Seromed). La culture s'effectue à 37°C sous atmosphère contrôlée (95 % air / 5 % CO₂). L'étude immunohistochimique des pièces d'ovaires est effectuée :

Les structures morphologiques sont conservées, avec du moins, une pycnose importante des cellules de la granulosa dans les grands follicules (antraux). En effet, ces follicules dégénèrent pendant les 24 heures de culture sans support hormonal. Les follicules préantraux, par contre, sont bien conservés. Ce résultat confirme leur relative autonomie vis à vis de stimulation gonadotrope.

On constate la persistance du marquage cytoplasmique des ovocytes des follicules préantraux (planche n° 9). Les conditions de culture appauvries en hormone ont provoqué l'atrésie de nombreux follicules antraux. Pour certains, on observe une pseudomaturation des ovocytes. La reprise de méiose n'est pas associée à une immunoréactivité de l'ovocyte.

Le nombre de follicules présentant une immunoréactivité des cellules de la granulosa est plus important in vitro

(planche n° 8). Ce marquage est observé dans les follicules préantraux et antraux.

Les cellules du tissu interstitiel (planche n° 9) sont également marquées. Dans certains follicules cavitaires atrétiques, quelques cellules thécales apparaissent marquées.

Ces résultats permettent de vérifier que les marquages immunohistochimiques sont conservés après survie des ovaires pendant 24 heures. La persistance, in vitro, de substances LH-RH like immunoréactives dans les structures ovariennes ainsi que leur apparition dans des types cellulaires supplémentaires (thèque interne), permet de confirmer l'hypothèse de la production endogène des peptides LH-RH like.

5°/ Marquage des axones des neurones à LH-RH dans l'éminence médiane de cerveau de cobaye.

Nous avons voulu vérifier l'existence d'un marquage des neurones à LH-RH dans les cerveaux de cobaye par notre Ac.

La planche n° 10 montre la réaction immunologique obtenue dans l'éminence médiane et l'observation des terminaisons axoniques marquées par notre antisérum. Cette réaction permet de confirmer l'identité immunologique entre le LH-RH hypothalamique et les facteurs LH-RH like gonadiques quand un Ac spécifique de la région C-terminale du décapeptide est utilisé.

6°/ Marquage immunohistochimique des ovaires de hamsters et de chat

Le LH-RH hypothalamique n'est pas spécifique d'espèce. Nous avons voulu vérifier, en immunohistochimie, si nous pouvions détecter avec notre Ac un marquage dans les ovaires de chat et de hamster.

Comme le montre la planche n° 11, on observe effectivement un marquage dans les cellules de la granulosa de follicules antraux chez le hamster, comme chez le chat. La disposition des cellules immunoréactives est révélatrice puisqu'elles se situent dans la zone périantrale et péri-ovocytaire de la couche de la granulosa.

DISCUSSION

Les résultats de l'étude ontogénique montrent que la quantité extraite de substances LH-RH like est beaucoup plus élevée dans les ovaires de rats immatures que dans les ovaires de rats adultes. Il existe une variation importante de l'IR LH-RH entre la période infantile (J0 - J10) où elle est maximale et la période juvénile (J10-J20).

Les taux observés durant ces différentes périodes laissent supposer un rôle physiologique du LH-RH like dans la régulation de la croissance de l'ovaire immature.

I. CROISSANCE FOLLICULAIRE PRECOCE ET LH-LH LIKE OVARIEN

La croissance folliculaire débute au 2^e jour chez le rat nouveau-né. Au 5^e jour, on observe les premiers follicules pluristratifiés, mais ce n'est pas avant J15 que les follicules antraux apparaissent en nombre significatif.

La présence de FSH est importante pour l'achèvement de la maturation dès que la croissance folliculaire a débuté.

On sait que des récepteurs à FSH existent dès J4 (Smith-White and coll. 1981b) et probablement dès J2, sur les cellules de la granulosa des follicules primaires (Weniger et coll. 1990). FSH est capable d'induire l'aromatase de la testostérone en oestradiol dans les ovaires de rats dès J4, en culture organotypique (Weniger et coll. 1990). Les capacités stéroïdogènes de l'ovaire sont donc en place dès la formation des follicules primaires.

Dans les conditions normales, en présence de FSH, la

folliculogénèse s'accomplit chez le rat en 16 à 19 jours (Hage et coll. 1978). En période néonatale ou infantile, le taux de FSH sérique est six à huit fois supérieur au taux nécessaire à la folliculogénèse adulte (Ojeda et coll. 1988). Il est également supérieur au taux du pic préovulatoire de FSH au cours du cycle oestrien.

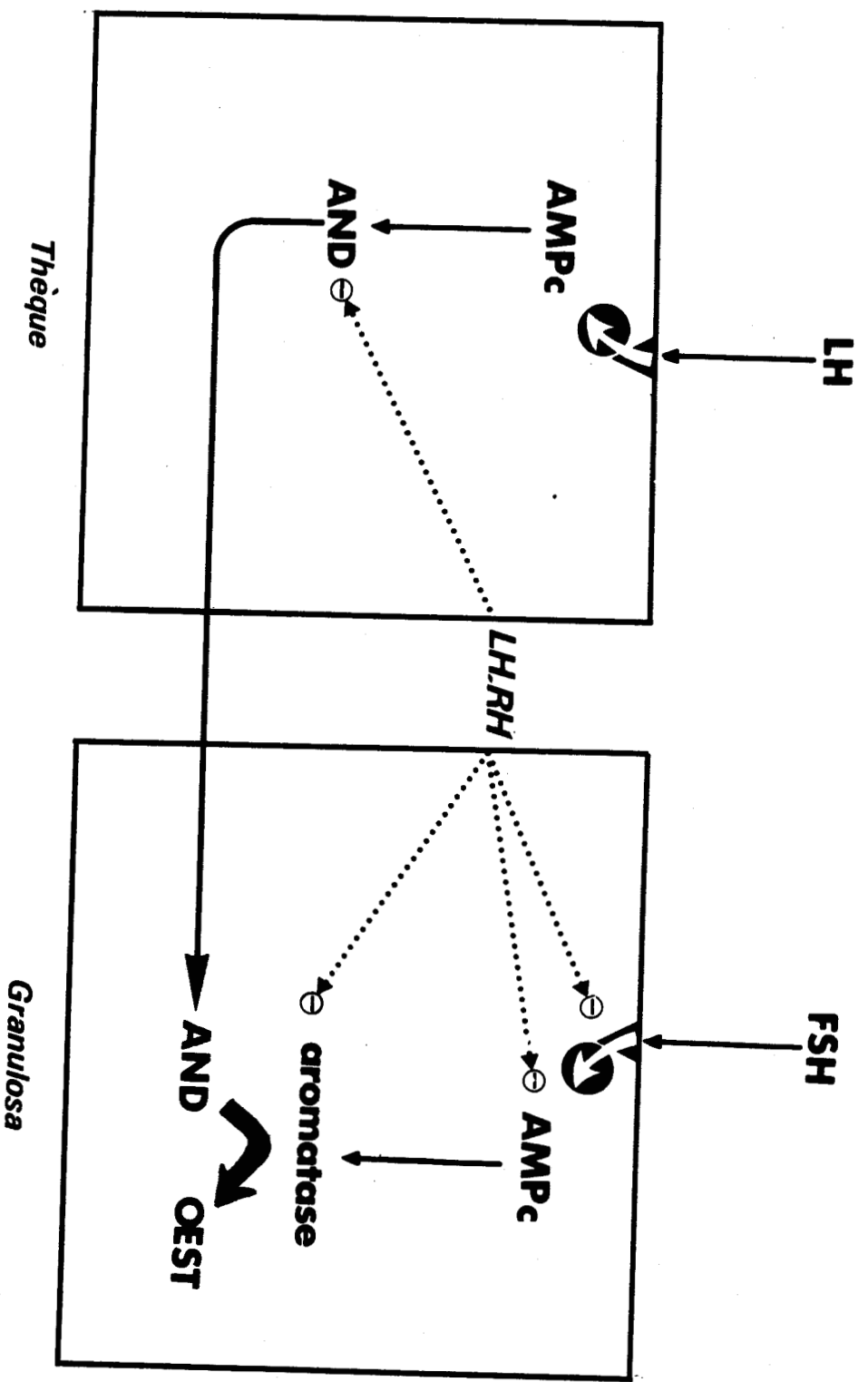
Or, malgré une croissance folliculaire qui débute à J2, et malgré un taux élevé de FSH sérique, il n'existe pas d'ovulation vers J18-J20. Il faut attendre une deuxième vague de croissance (follicules débutant leur évolution entre le 15^e et le 20^e jour) pour atteindre la première ovulation entre J38 et J40.

Ainsi, l'ovaire paraît relativement insensible à FSH au cours de la petite enfance. Cette "résistance" peut résulter de deux phénomènes : soit une down-regulation des récepteurs à FSH entraînée par les taux élevés circulants (Jonassen et coll. 1980, Jonassen et coll. 1982) soit la présence d'un ou plusieurs facteurs inhibiteurs de l'action de FSH.

Les taux élevés de LH-RH observés dans les extraits ovariens de ratons et les actions "anti-FSH" bien connues du LH-RH permettent de poser l'hypothèse de l'implication du LH-RH dans le contrôle de la croissance folliculaire précoce chez le rat.

Le LH-RH inhibe les effets stimulants de FSH par, au moins, trois mécanismes dans les cultures cellulaires de granulosa (Figure n° 23).

- Le LH-RH diminue le taux d'AMPc stimulé par FSH



(Massicotte et coll. 1980, Knecht et coll. 1981b, Zilberstein et coll. 1984), vraisemblablement en stimulant l'activité phosphodiesterase intracellulaire (Jones et coll. 1983) et extracellulaire (Knecht et coll. 1981a).

- Le LH-RH inhibe la production de récepteurs à FSH stimulée par FSH (Hsueh et coll. 1980, Ranta et coll. 1983, 1984).

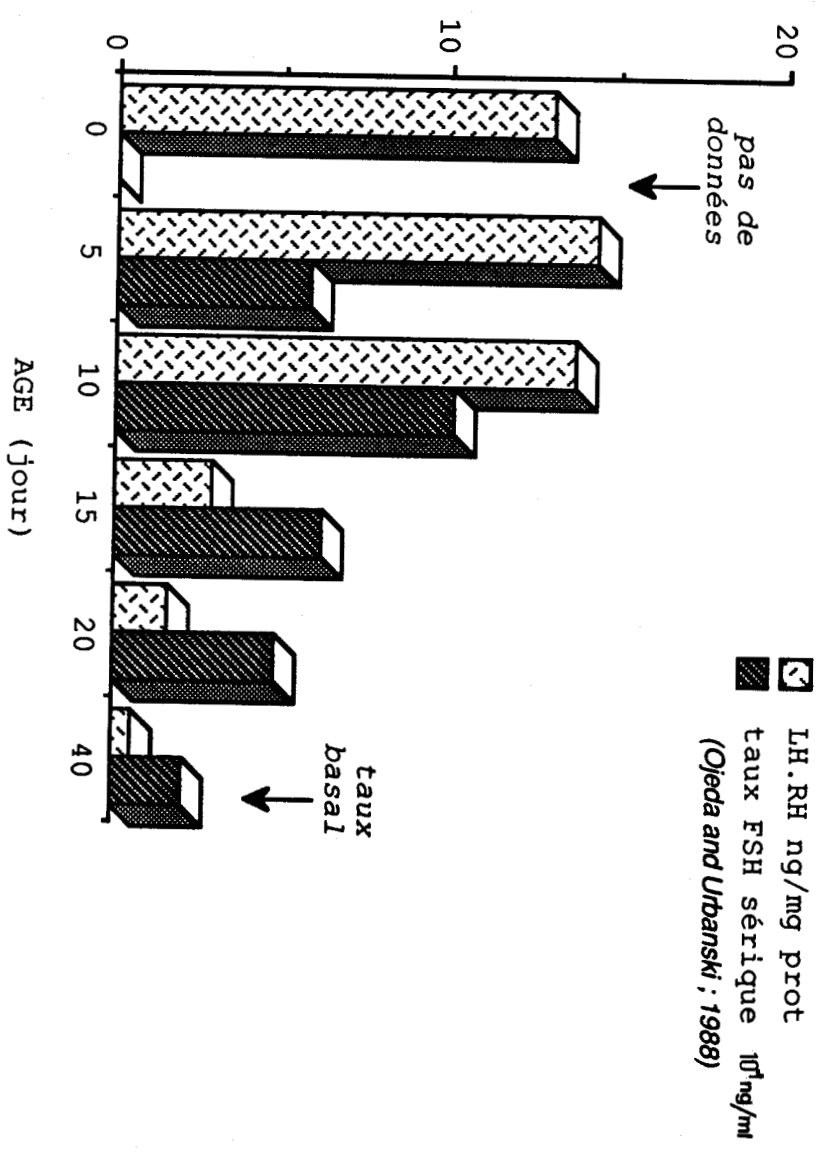
- Le LH-RH provoque un découplage du récepteur FSH avec l'adénylcyclase (Ranta et coll. 1984). Cet effet est indépendant du stade folliculaire.

Un mécanisme supplémentaire a été proposé par Dorrington et coll. (1984). Le LH-RH inhiberait l'augmentation FSH induite des sites de fixation intracellulaires de l'AMPc.

Le LH-RH, en tant qu'agent "anti FSH" pourrait donc être impliqué dans l'inhibition de la croissance de l'ovaire immature. La variation du taux d'ir LH-RH en fonction de l'âge est parallèle à la variation des taux sériques de FSH. Au pic FSH observé à J10 est associé le pic d'ir-LH-RH ovarien. (Figure n° 24).

Des études récentes ont démontré la présence d'ARNm du LH-RH dans l'ovaire de rate et la stimulation de sa production par FSH (Sakakibara 1989).

La stimulation par FSH de la synthèse d'un facteur inhibiteur de sa propre action est un mécanisme déjà connu pour un autre facteur ovarien : l'inhibine (Bicsak et coll. 1986) FSH stimulerait donc la production d'inhibiteurs de croissance de deux types : l'un, l'inhibine, rétroagissant au niveau



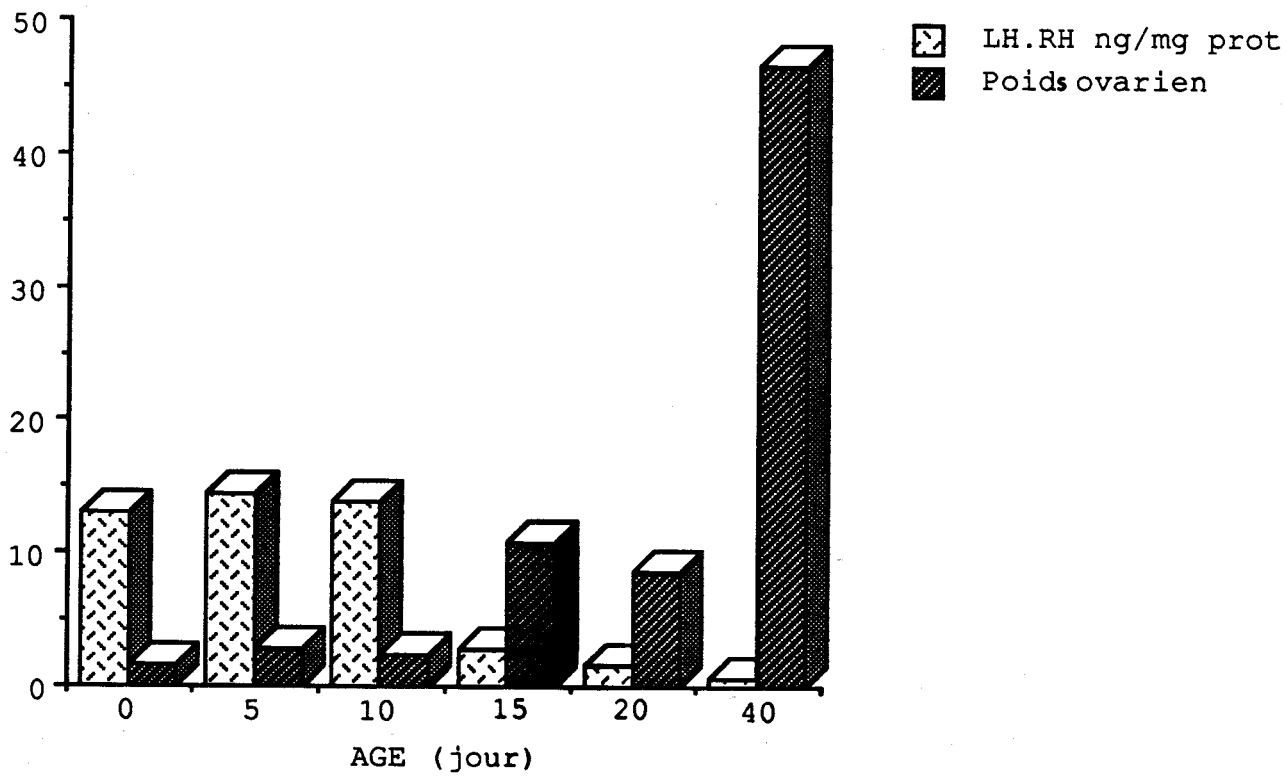
hypophysaire et inhibant la libération de FSH, l'autre le LH-RH agissant localement et inhibant les effets de FSH sur son organe cible.

L'hypothèse d'une "balance" physiologique entre l'action stimulatrice de FSH et l'action inhibitrice de peptides ovariens, tels que le LH-RH, a été suggérée par les résultats de plusieurs auteurs. Le LH-RH est ses agonistes inhibent l'augmentation FSH induite du poids ovarien chez les rates immatures hypophysectomisées, prétraitées par le diéthylstilbestriol (Hsueh and coll. 1979, 1980, Birnbaumer et coll. 1985, Harwood et coll. 1980b).

L'exposition chronique au LH-RH exogène en période post natale retarde la puberté (Rippel and coll. 1976, Johnson et coll. 1976, Ying et coll. 1979).

In vivo, nous observons que les quantités de LH-RH endogène sont très importantes à une période où le poids ovarien varie très peu (1.6 mg à la naissance à 2.8 mg à 10 jours) (Figure n° 25). Une prise de poids ovarien massive est observée entre 15 et 40 jours. Elle est associée à une diminution du taux d'ir LH-RH jusqu'à une valeur indétectable chez les rates de plus de 3 mois. Dès J15, nous observons une diminution d'ir LH-RH au moment d'un recrutement massif de follicules. Ces follicules participeront probablement à la première ovulation.

L'ontogénèse des récepteurs ovariens du LH-RH a été étudiée chez le rat : des sites de fixation du LH-RH ont été mis en évidence in vivo dans les ovaires de rats immatures



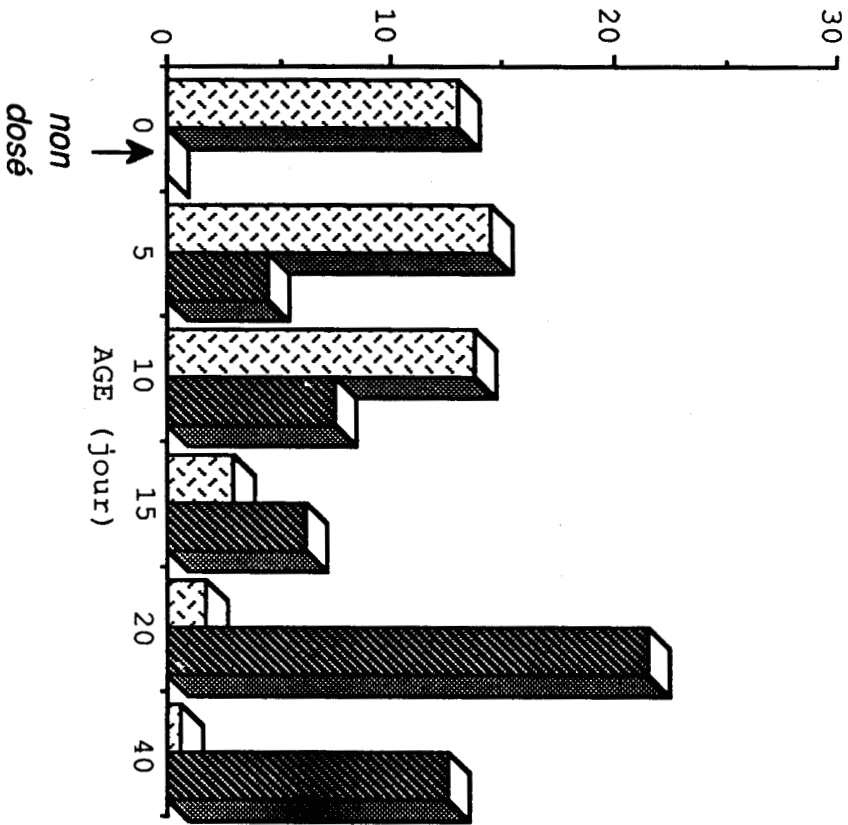
(Harwood et coll. 1980a et b, Dalkin et coll. 1981, Smith-White et coll. 1981a et b). Ces récepteurs ovariens ont une spécificité et une affinité identique à leurs homologues hypophysaires (Jones et coll. 1980, Reeves et coll. 1980, Clayton et coll. 1981). Ils sont situés sur les cellules de la granulosa (Ranta et coll. 1982), les cellules thécales (Pelletier et coll. 1982) et les cellules du tissu interstitiel (Marchetti et coll. 1987).

Les récepteurs ne sont pas détectables avant J5 chez le rat, puis on observe des variations importantes de leur taux pendant la maturation sexuelle (Dalkin et coll. 1981, Smith-White et coll. 1981a et b, 1984, Marchetti et coll. 1987) (Figure n° 26).

Par contre, on observe peu ou pas de changement au cours du cycle oestrien chez l'adulte (Pieper et coll. 1981, Köves et coll. 1989).

Le taux de récepteurs est en moyenne très élevé dans l'ovaire impubère (Smith-White et coll. 1983). Le LH-RH a une action stimulatrice sur la synthèse de ses propres récepteurs (up-regulation) (Pieper et coll. 1981, Popkin et coll. 1983). Nous avons confirmé que ce taux élevé de récepteurs est associé à une concentration importante d'ir LH-RH.

Entre J5 et J15, le taux de récepteurs est inférieur à celui de la période J20 à J40. Un traitement par $MgCl_2$ permet de vérifier le nombre total de récepteurs (Smith-White et coll. 1984). Le nombre de récepteurs "libres" est nettement inférieur entre J5 et J10. Ce résultat suggère qu'un certain



LH. RH ng/mg prot
 bound LHRH/mg protein
 (Smith-white and Ojeda ; 1984)

nombre de sites sont occupés par un ligand endogène. Le taux de récepteurs "libres" augmente de J20 à J40, évoquant une diminution de fixation du ligand endogène (Smith-White et coll. 1984, Marchetti et coll. 1987). C'est ce que nous vérifions pour nos résultats de dosages. A J40, le taux global de récepteurs ("liés" + "libres") est abaissé, et nous observons à cet âge une forte chute de l'ir LH-RH (Smith-White et coll. 1981).

Cette corrélation apporte un argument supplémentaire du rôle physiologique de LH-RH dans l'ovaire immature.

II. DISCUSSION SUR LA LOCALISATION CELLULAIRE DE L'ir-LH-RH

Les études immunocytochimiques permettent de détecter quel(s) type (s) cellulaire (s) est associé à l'action inhibitrice du LH-RH. Il faut noter, cependant, que la localisation d'immunoréactivité ne permet pas à l'échelle de la microscopie optique de déterminer si la substance révélée est synthétisée ou captée par la cellule.

Trois types cellulaires présentent une immunoréactivité au LH-RH :

- * les cellules de la granulosa dans certains
 mais pas tous les follicules
- * les ovocytes de follicules préantraux
- * le tissu interstitiel.

1°/ Marquage immunohistochimique des cellules de la granulosa

Seules certaines cellules de la granulosa sont marquées en immunohistochimie par le sérum anti LH-RH. Le marquage n'est retrouvé qu'à certains stades folliculaires (primaire, secondaire). Il n'est pas présent dans toutes les cellules

de ces follicules. On note cependant que les cellules immuno réactives sont toujours groupées.

Après culture d'ovaires de rates âgées de 20 jours, on observe une immunoréactivité au LH-RH dans les follicules antraux précoces. La disposition des cellules immunoréactives est alors constante : l'ir LH-RH est observée dans les cellules qui bordent la cavité antrale.

Aucun marquage n'est observé dans les grands follicules involués.

La présence d'ir LH-RH dans les cellules de la granulosa dépend donc du stade de maturation des follicules. Au sein d'un même groupe, tous les follicules ne sont pas immunoréactifs. Ce résultat confirme l'hétérogénéité de la population folliculaire.

Au sein même du follicule, toutes les cellules ne sont pas immunoréactives, ceci suggère que les cellules de la granulosa ne sont pas synchrones. Plusieurs populations de cellules de la granulosa coexistent au sein d'un follicule. Ces cellules diffèrent par leur capacité stéroïdogène et leur sensibilité aux gonadotrophines (Kasson et coll. 1985).

L'hétérogénéité du marquage ir LH-RH dans la population folliculaire est significative de l'hétérogénéité fonctionnelle des follicules au cours de la croissance. La présence de LH-RH dans certains follicules pourrait refléter la transition du follicule vers l'atrésie. Ledwitz-Rigby (1987) montre que les récepteurs du LH-RH sont en majorité localisés sur les cellules de la granulosa de follicules atrétiques (étude

chez le porc).

Par ailleurs, le LH-RH induit la reprise prématurée de méiose des ovocytes de follicules tertiaires de diamètre inférieur à 350 μm chez le rat. Les follicules primordiaux et primaires sont insensibles à cette action. Seulement 0.9 % des ovocytes de follicules secondaires reprennent leur méiose sous l'action de LH-RH exogène. Ce phénomène peut résulter de la "non-compétence" des ovocytes à ces stades précoces de la folliculogénèse. Par contre, les follicules tertiaires de diamètre supérieur à 400 μm semblent insensibles au LH-RH. Tout comme dans l'étude précédente, chez le porc, 70 % des petits follicules tertiaires sensibles à l'action du LH-RH sont atrétiques (Banka et coll. 1985).

Ces deux expérimentations démontrent que la sensibilité des follicules à l'action du LH-RH dépend de leur stade fonctionnel : elle semble associée à l'atrésie folliculaire.

Cette dernière hypothèse repose sur les constatations suivantes :

1. Les récepteurs à LH-RH sont principalement localisés dans les cellules de la granulosa des follicules atrétiques (Banka et coll. 1985, Ledwitz-Rigby 1987).
2. Le LH-RH exogène diminue de façon dose dépendante les fonctions FSH induites (cf. Chapitre précédent). En particulier le LH-RH inhibe l'activité d'aromatase FSH induite (Liang et coll. 1989, Hsueh et coll. 1980). Les modulations de l'aromatase sont impliquées dans le processus d'atrésie en modifiant le rapport intra folli-

culaire androgène/oestrogène responsable du devenir du follicule (Dizerega 1987, Ledwitz-Rigby 1987, Hillier 1987)

3. L'administration de LH-RH ou de ses agonistes provoque la reprise de méiose des ovocytes des follicules atrétiques. (Banka et coll. 1985).
4. In vivo, le traitement par un agoniste du LH-RH inhibe la croissance folliculaire et augmente le pourcentage de follicules atrétiques. Cet effet est annulé par l'action d'un antagoniste du LH-RH (Birnbaumer et coll. 1985).

L'apparition de l'ir LH-RH dans les cellules de la granulosa pourrait donc être associée au processus atrétique. La localisation immunohistochimique de l'ir LH-RH dans les cellules bordant la cavité antrale suggère très fortement ce lien. C'est en effet, dans ces cellules, que débute l'atrésie de la granulosa (Byskov 1974).

Dans les follicules préantraux observés, les cellules immunoréactives ne présentent pas de signes histologiques d'atrésie (pycnose des cellules de la granulosa, dégénérescence de l'ovocyte). On sait que les modifications biochimiques de l'atrésie précèdent les modifications morphologiques.

L'apparition d'ir LH-RH dans les cellules de la granulosa pourrait être un marqueur précoce de l'atrésie folliculaire avant même l'apparition des critères morphologiques. Cette hypothèse peut expliquer l'hétérogénéité de marquage au sein de la population folliculaire et cellulaire.

2°/ Marquage immunohistochimique des ovocytes des follicules préantraux

Nous observons une forte immunoréactivité cytoplasmique des ovocytes des follicules préantraux à tous les âges étudiés. Par contre, au delà du stade antral, on n'observe aucun marquage des ovocytes.

La régulation de l'initiation de la croissance folliculaire et ovocytaire est inconnue. On sait qu'elle est indépendante des gonadotrophines puisqu'elle se poursuit chez l'animal hypophysectomisé. Elle semble plutôt résulter d'interactions entre l'ovocyte et la granulosa vraisemblablement par l'intermédiaire de facteurs paracrines.

Le LH-RH peut-il être impliqué dans cette régulation ?

Son taux élevé dans l'ovaire néonatal et sa localisation immunohistochimique constante dans l'ovocyte des follicules primordiaux permettent d'envisager cette hypothèse.

Trois phénomènes interviennent dans l'initiation de la croissance :

- la sortie du stock de follicules primordiaux quiescents
- la différenciation et la multiplication des cellules de la granulosa
- la croissance de l'ovocyte qui aboutit à l'acquisition de sa "compétence" à reprendre la méiose.



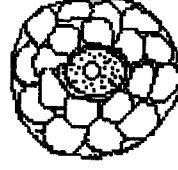


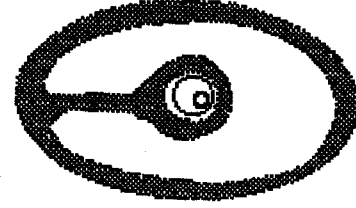
Cette période d'initiation débute par le recrutement des follicules primordiaux et se termine au stade de follicule secondaire. Avant la formation de l'antrum, l'ovocyte a fini sa croissance.

Il est à remarquer que chez l'Homme, c'est la période la plus longue de la folliculogénèse. Elle dure plus de 270 jours, alors que la phase de croissance "sélection" et "maturation" du follicule dominant ne s'étend que sur 85 jours (Gougeon 1986).

Nos résultats amènent plusieurs conclusions :

- * la présence de LH-RH like dans l'ovocyte de rat résulte d'une production intra ovarienne puisque le marquage immunohistochimique est maintenu après culture de l'ovaire pendant plus de 24 heures. Le lieu de synthèse à ce stade (granulosa ou ovocyte) reste à déterminer.
- * la présence de LH-RH like est associée à la phase d'initiation de la croissance folliculaire, et ceci, durant toute la vie génitale (tableau n°8).
- * les taux élevés de LH-RH like après extraction d'ovaires infantiles renforcent ces hypothèses car la croissance folliculaire ne dépasse pas le stade préantral avant l'âge de 15 jours.

Les ovocytes arrêtés en prophase de première division méiotique s'entourent de cellules folliculaires dès J1. Ils peuvent rester ainsi quiescents pendant plusieurs années chez la rate. Les premiers événements de la croissance du follicule sont la multiplication des cellules de la granulosa et leur organisation en cellules cubiques épithélioïdes autour de l'ovocyte. Ce stade constitue le follicule primaire. La différenciation précoce des cellules de la granulosa et leur organisation dans le follicule semble influencée largement

	PRIMORDIAUX	PRIMAIRES	SECONDAIRES	TERTIAIRES		PREOVULATOIRE
						
	12 µm	17 µm	125 µm	200 µm	400 µm	600 µm
Foll. présents différents âges (rat)	J0 J5 J10 J15 J20 J40	J5 J10 J15 J20 J40	J10 J15 J20 J40	J15 J20 J40	J20 J40	J40
Compétence de l'ovocyte Sorensen et Wassarman 1976	-	-	-/+	+	+	+
Reprise de méiose stimulée par LH-RH (rat) Banka et Erickson 1985	-	-	0,9%	25 à 30%		+
				+ 70% atretiques de diamètre inf à 400µm	-	
Recepteurs LH-RH ovocytaire (rat) Dekel 1988	?	?	?	?	?	+
ir LH-RH ovocytaire (rat) Nos résultats	+	+	+	+/-	-	-
Recepteurs LH-RH Granulosa (rat) Marchetti et coll 1987	-	+	+	+	+	+

par des interactions avec les ovocytes.

Parallèlement, se mettent en place des "contacts" cellulaires spécialisés, les "gap-junctions" ou jonctions communicantes, entre l'ovocyte et la granulosa. Ces "gap-junctions" sont présentes dès J4-J5 chez le rat dans les follicules primaires unistratifiés (Fletcher 1979). Elles sont nécessaires à la croissance de l'ovocyte en permettant un couplage métabolique entre les deux types de cellules. En effet, l'ovocyte ne possède pas tous les "métabolites" (acides aminés, acides nucléiques) nécessaires à sa croissance. La vitesse de croissance de l'ovocyte, in vitro, est positivement corrélée avec le nombre de "gap-junctions" (Brower et coll. 1982).

La disparition progressive du LH-RH dans l'ovocyte en croissance est-elle associée à une levée d'inhibition ?

Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse : Le LH-RH a une action inhibitrice sur la différenciation des cellules de la granulosa de porc in vitro (Maruo et coll. 1985). Les cellules de la granulosa obtenues à partir de petits follicules, et cultivées dans un milieu sans hormone, ont au bout de 6 heures un aspect fibroblastique caractéristique. Lorsque hCG ou l'insuline sont ajoutés à la culture, les cellules se différencient et prennent un aspect épithélioïde. Cet effet est complètement annulé par l'addition simultanée de LH-RH.

Un effet semblable est observé pour les cellules de granulosa de rat (Knecht et coll. 1985) : au bout de 24 heures

de culture, FSH provoque l'agrégation des cellules de la granulosa qui prennent un aspect épithélioïde. LH-RH provoque la rupture des agrégats cellulaires et les cellules de la granulosa reprennent un aspect fibroblastique.

Ces résultats montrent, non seulement, que le LH-RH inhibe la différenciation cellulaire induite par les gonadophines, mais aussi interrompt le couplage cellule / cellule.

En effet, le LH-RH inhibe la formation FSH induite des "gaps junctions" entre les cellules de la granulosa (Amsterdam et coll. 1981), mais également une interruption complète du contact ovocyte / cellule de la corona radiata dans les follicules préovulatoires (Erickson et coll. 1983). Cette action semble se produire de façon directe par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques du LH-RH présents sur les cellules de la granulosa (Clayton et coll. 1981).

Ainsi le LH-RH peut jouer un rôle dans la quiescence des follicules primordiaux en maintenant un découplage ovocyte / cellule de la granulosa de façon à inhiber la croissance ovocytaire et la différenciation des cellules de la granulosa.

3°/ LH-RH et tissu interstitiel

Un marquage immunohistochimique est observé dans le tissu interstitiel dès J15. Des récepteurs au LH-RH ont été mis en évidence par autoradiographie dans ce tissu par certains auteurs (Marchetti et coll. 1987).

Des actions directes du LH-RH et de ses agonistes ont été démontrées sur les cellules interstitielles isolées (Magoffin et coll. 1981). Le LH-RH inhibe la production

basale et stimulée par LH d'androstérone chez les rates de 21 jours hypophysectomisées.

Cette action in vitro est médiée par l'inhibition du complexe enzymatique 17 α hydroxylase-C12,20 lyase, enzyme bloquant l'étape de transformation de la prégnenolone et progestérone en DHEA et androsténedione respectivement (Magoffin et coll. 1982).

Rappelons que les androgènes sont les précurseurs des oestrogènes. Ils sont élaborés par les cellules thécales des follicules antraux et par les cellules du tissu interstitiel puis sont aromatisées dans la granulosa en oestrogènes.

Dans l'ovaire néonatal et infantile de rat, la population folliculaire est constituée de follicules préantraux uniquement. Les cellules thécales stéroïdogènes ne sont pas encore différenciées à ce stade de croissance. La présence histochimique d'enzyme de la stéroïdogénèse a été détectée dès J4-J5 dans le tissu interstitiel de rat (Quattropani et coll. 1973). Il semble que la production d'androgènes dans l'ovaire prépubère soit assurée par les cellules interstitielles.

La présence d'ir LH-RH dans ces cellules peut représenter un mécanisme de régulation de la stéroïdogénèse et donc indirectement de la croissance folliculaire. Une inhibition de la production d'androgène entraîne une diminution de la production d'oestrogènes et par conséquent une inhibition de la croissance de la granulosa.

CONCLUSION GENERALE

Les rôles respectifs de FSH et LH dans le contrôle ovarien sont largement connus. Depuis quelques années, l'avènement de la "paracrinologie" a permis d'admettre d'autres mécanismes de régulation cellulaire à l'intérieur même d'un organe, et fait appel à des notions de "modulation" d'action d'autres facteurs endocrines.

Le LH-RH like gonadique après avoir été énormément étudié entre 1979 et 1985 ne semblait plus être un candidat suffisamment sérieux pour la dénomination de facteur paracrine ovarien. Avec le développement de la lutte thérapeutique contre les stérilités, féminines et masculines, et les nombreuses techniques utilisées en PMA, le LH-RH, en tant que facteur intraovarien redevient un sujet d'étude important. Notre travail s'intègre dans ce cadre, avec la recherche d'un schéma d'observation, d'étude et de compréhension du rôle des substances LH-RH like sur la physiologie ovarienne.

Nous avons axé notre étude sur leur détection immunologique et la première étape de notre travail a consisté en la fabrication et la caractérisation d'un Ac anti LH-RH à partir de la séquence hypothalamique connue. L'Ac anti LH-RH obtenu après hyperimmunisation chez le lapin est spécifique de la région C-terminale du décapeptide. Cette séquence épitopique est commune au LH-RH hypothalamique et gonadique comme nous l'avons vérifié en immunohistochimie.

Nous avons ensuite entrepris une étude de caractérisation immunologique des substances LH-RH like ovariennes à partir d'extraits tissulaires de hamsters hyperstimulés.

Nous avons mis en évidence deux formes immunoréactives de poids moléculaire 16 000 Da et 8 000 Da qui pourraient correspondre aux précurseurs ovariens du LH-RH puisqu'elles possèdent en commun, avec leurs homologues hypothalamiques, le poids moléculaire et l'identité immunologique.

La détection d'une troisième substance de poids moléculaire avoisinant 41 000 Da n'a pas été vérifiée en dosage E.L.I.S.A. et le problème de sa nature exacte reste posé. Après fractionnement de l'extrait ovarien, nous avons détecté une substance immunoréactive de poids moléculaire inférieur à 1500 Da, (coéluant avec le LH-RH synthétique en gel filtration G15), qui pourrait représenter le peptide actif. L'étude des caractéristiques chimiques de cette forme moléculaire a montré qu'elle était plus hydrophobe que le LH-RH natif. Ainsi, dans notre étude, comme dans la littérature, le "LH-RH like gonadique" n'apparaît pas identique au LH-RH hypothalamique.

Cependant, il ne semble pas spécifique d'espèce comme l'indiquent nos études chez le rat, le hamster, le chat et l'homme. Un processus d'épissage tissus spécifique de l'ARN messager, ou de précurseurs du LH-RH pourrait être envisagé dans ce cas.

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étudié l'ontogénie des substances LH-RH like gonadiques chez le rat. L'association de techniques morphologiques

(immunohistochimiques) et de techniques d'extraction et de dosage (E.L.I.S.A.) de l'ir LH-RH nous a permis d'aborder l'étude du rôle de ces facteurs dans la folliculogénèse.

Les interactions endocrines, paracrines et / ou autocrines qui régissent la folliculogénèse dans l'ovaire adulte cyclique, les différents stades de différenciation folliculaires qui y coexistent, les évènements de sélection de follicules et le recrutement par vague de croissance incessante de nouveaux follicules, et enfin, les phénomènes d'atrésie folliculaire qui en découlent, rendent l'étude expérimentale chez l'adulte d'une inextricable complexité. L'animal impubère est en cela, un modèle expérimental intéressant : l'initiation de la folliculogénèse chez la rate se produit le jour de la naissance et ses différentes étapes peuvent être "arrêtées" par une étude chronologique du développement de l'ovaire. Ainsi nos résultats en dosage E.L.I.S.A. et en immunohistochimie chez le rat âgé de 0, 5, 10, 15, 20 et 40 jours ont permis de détecter une importante quantité de LH-RH like pendant la période infantile et juvénile de l'animal. Le rôle inhibiteur du LH-RH sur la croissance folliculaire ayant déjà été étudié, l'existence de taux important d'ir LH-RH pendant cette période pourrait représenter un mécanisme qui empêche les follicules de progresser jusqu'à une maturation totale avant la puberté.

En effet, on observe la présence d'immunoréactivité au LH-RH dans les deux types cellulaires stéroïdogéniquement actifs chez l'animal immature : les cellules de la granulosa

et les cellules interstitielles. La localisation de ces substances immunologiquement apparentées au LH-RH dans les ovocytes de follicules préantraux est une donnée nouvelle, dont l'interprétation va nécessiter de nouvelles expérimentations.

La multiplicité des actions mises en jeu par les substances de type LH-RH, souligne toute l'importance de l'étude de ce système dans la régulation de la fonction gonadique et son intérêt dans la lutte contre les stérilités humaines.

Quoiqu'il en soit, l'ovaire impubère reste un modèle idéal pour l'étude des facteurs paracrines. C'est dans ce contexte où les fonctions ovariennes sont inhibées, que l'on pourra étudier la fonction du LH-RH like gonadique.

Parallèlement à ces recherches, les informations que nous avons pu collecter au cours de cette étude ont déjà fait l'objet d'une extension à l'espèce humaine dans le cadre d'un D.E.A. de Sciences de la Vie et de la Santé (F. Lecuru, P. Saint Pol, J. Leonardelli).

PLANCHES





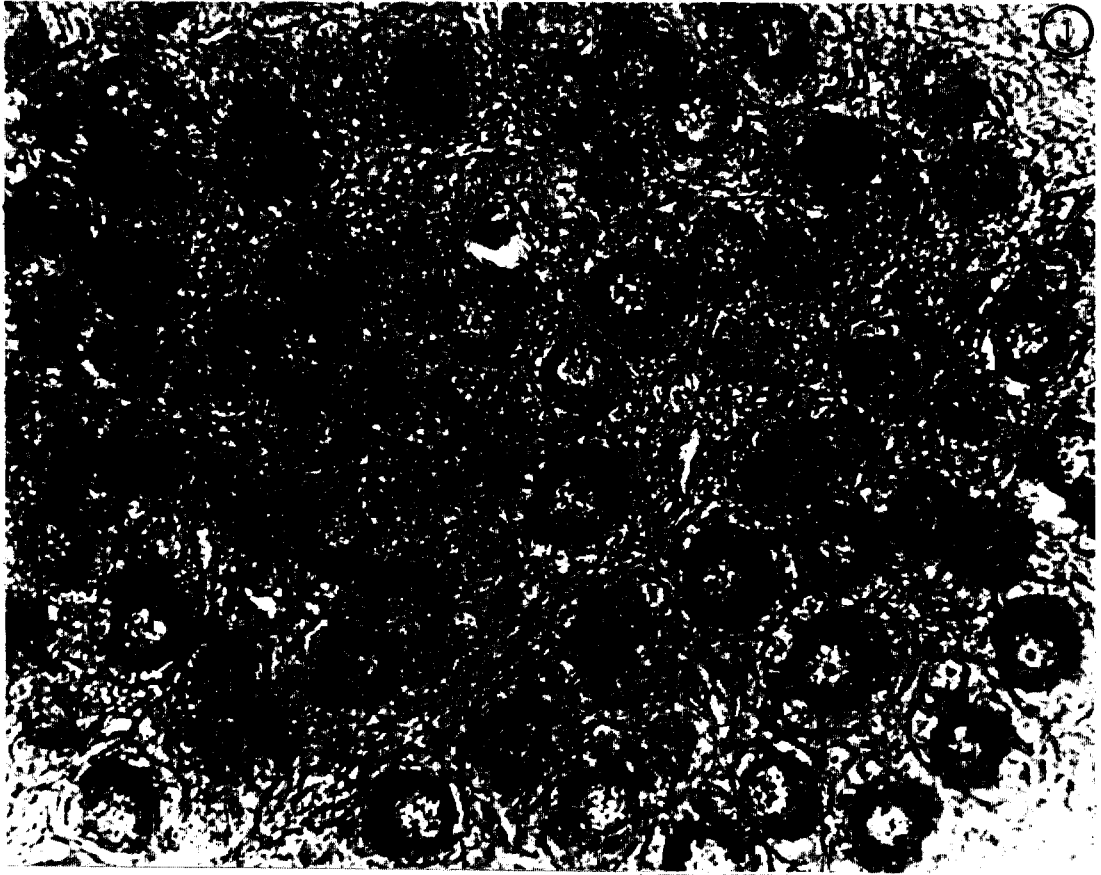
①

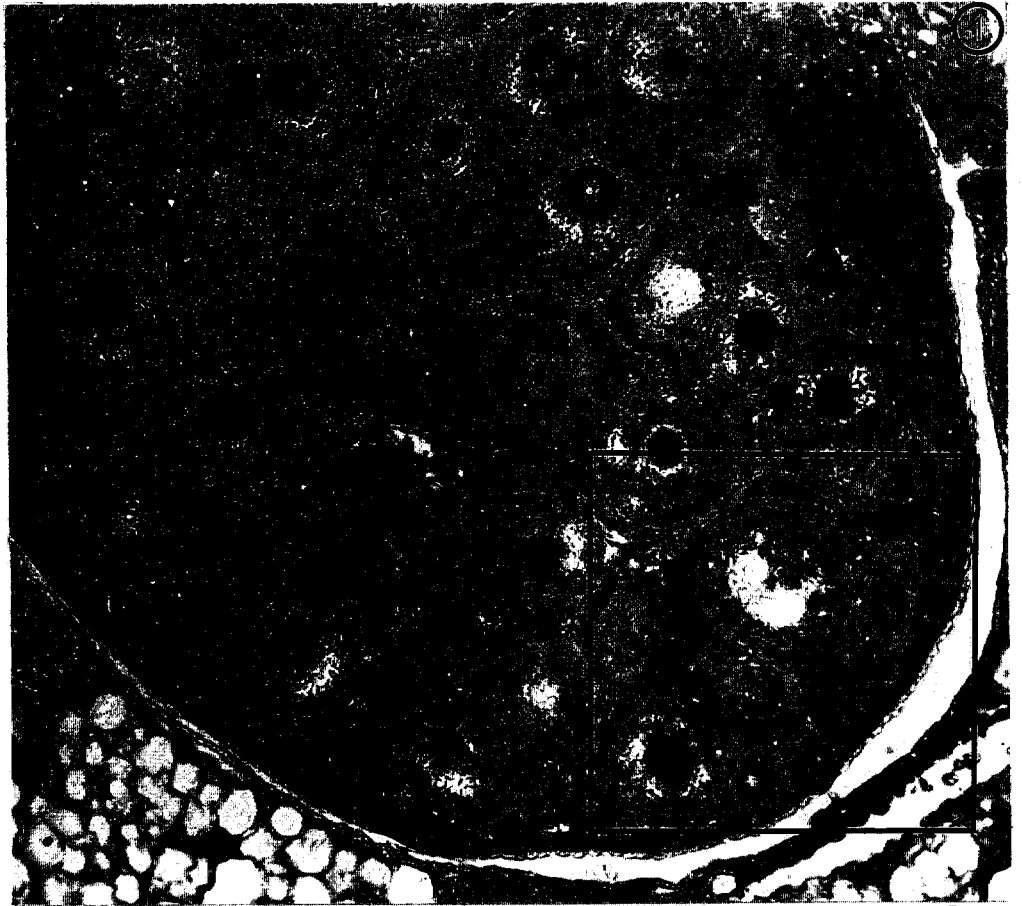
J0



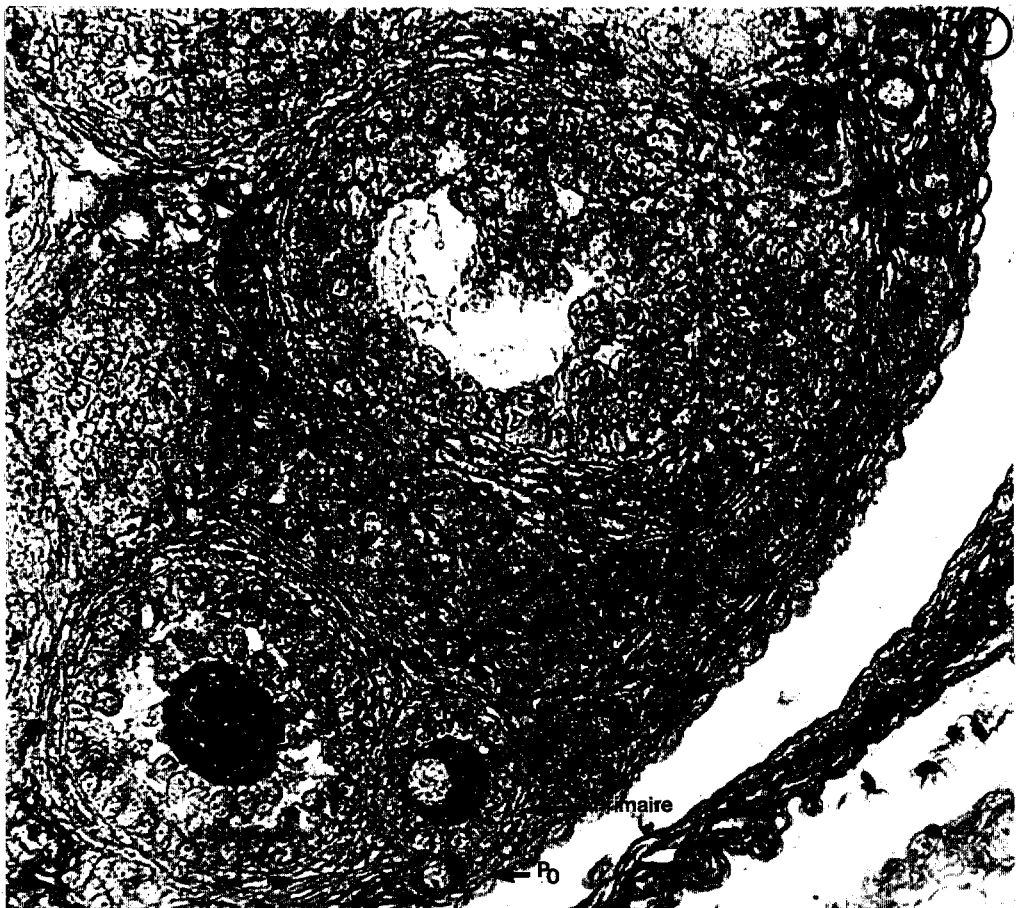
②

J5

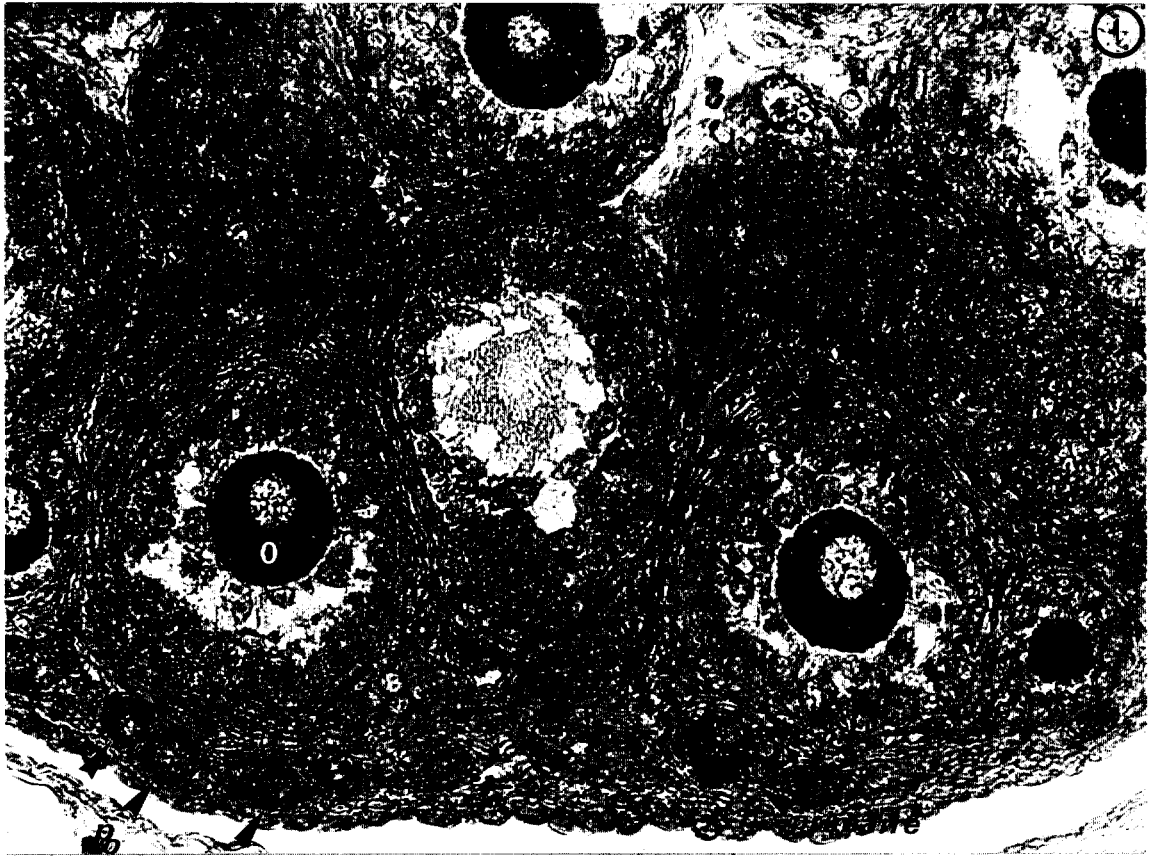




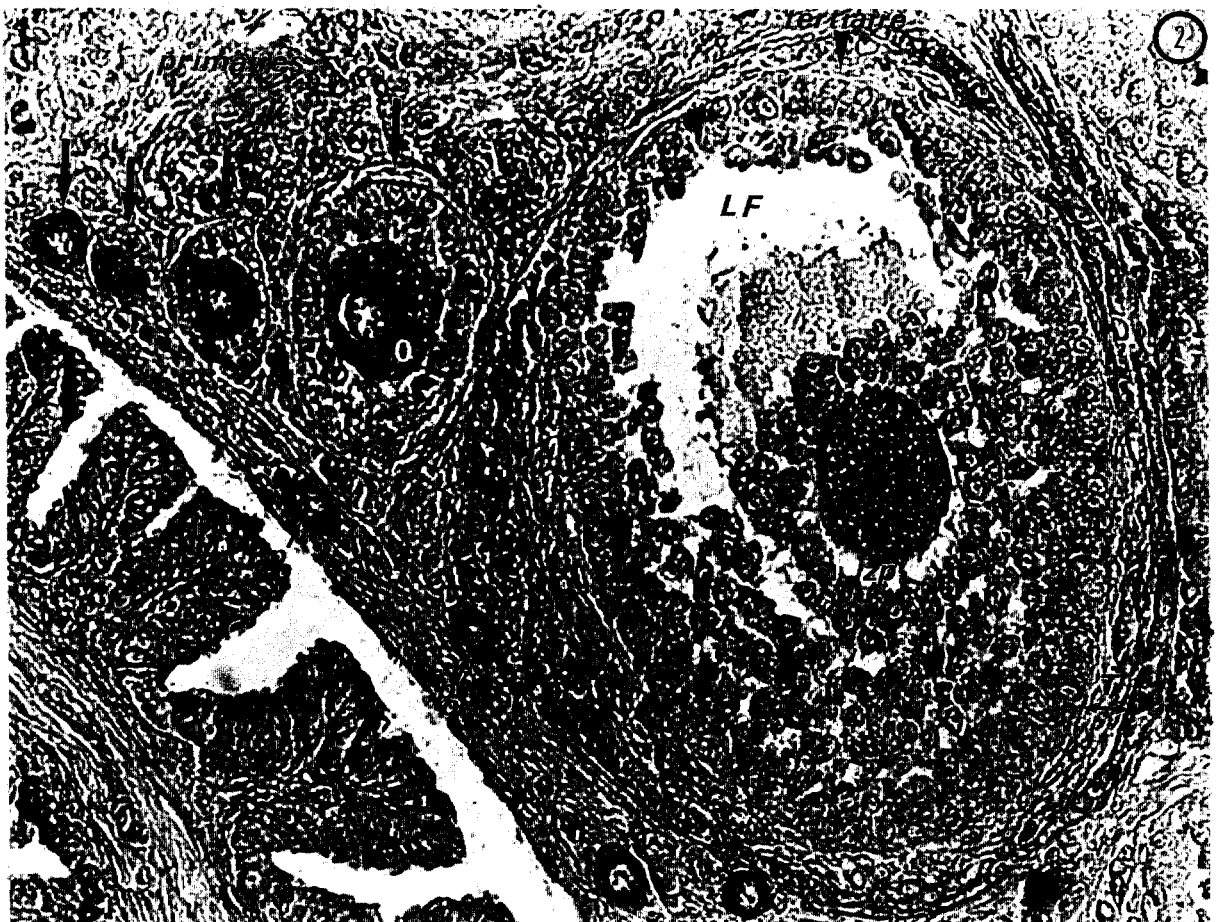
J10



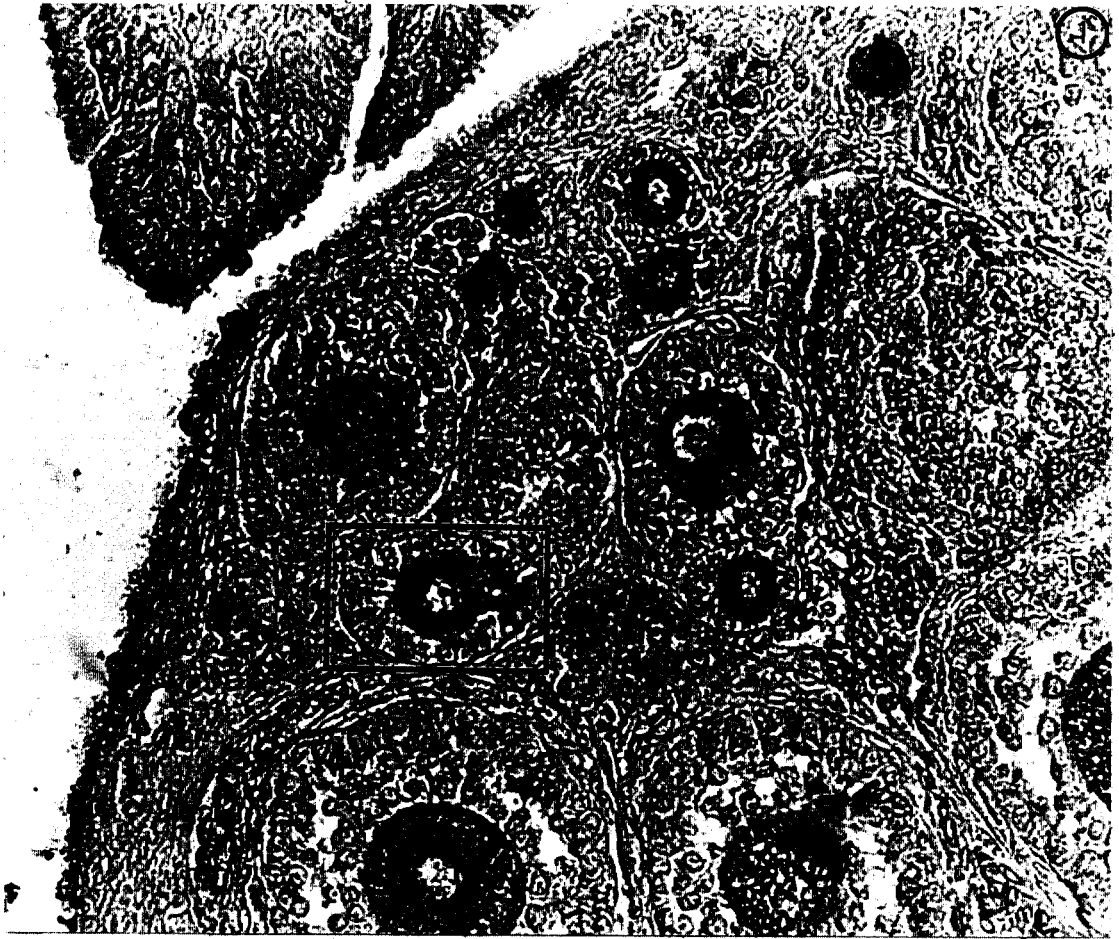
J10

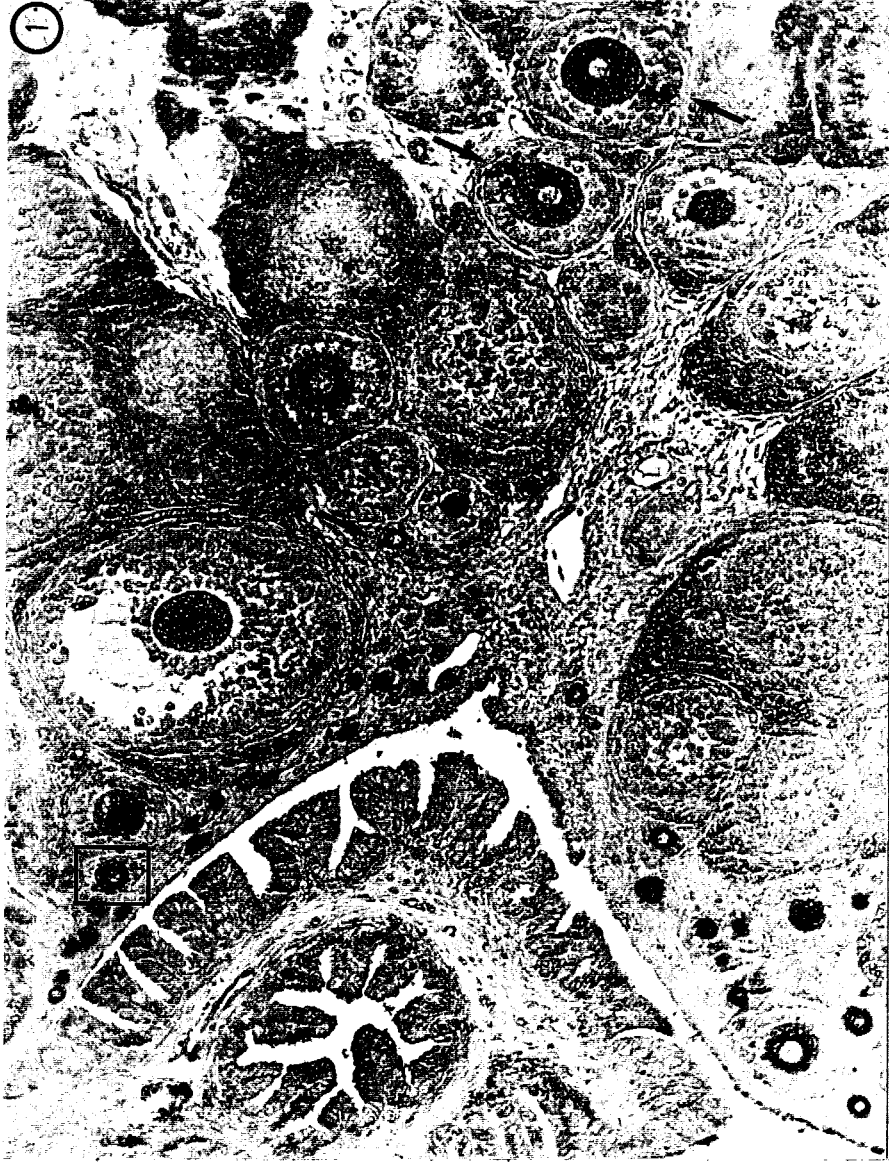


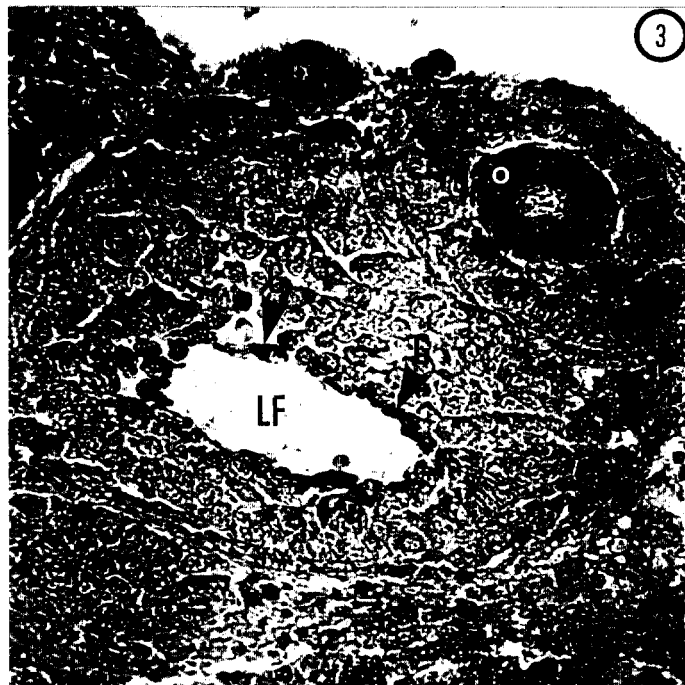
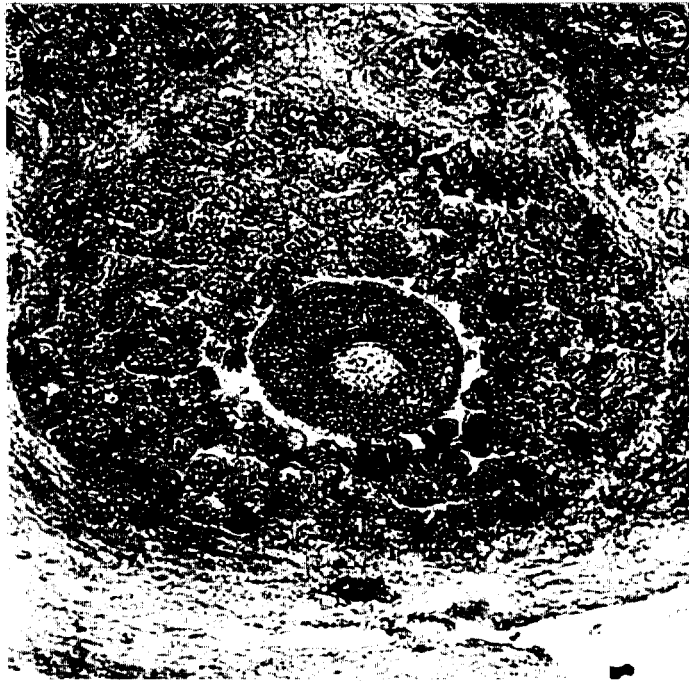
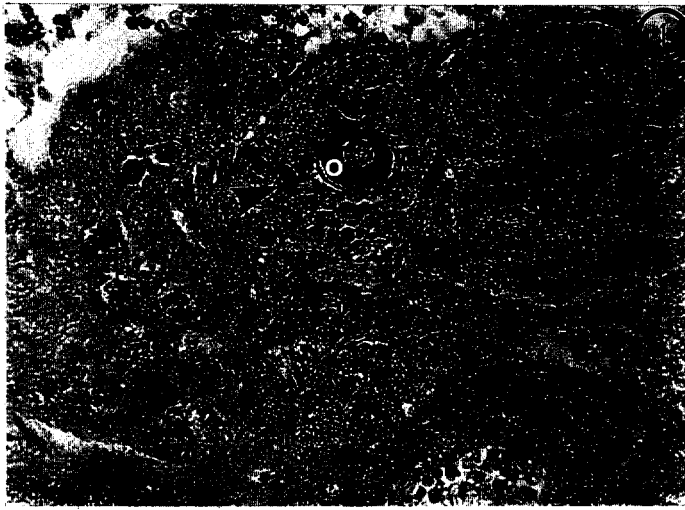
J 15



J 20









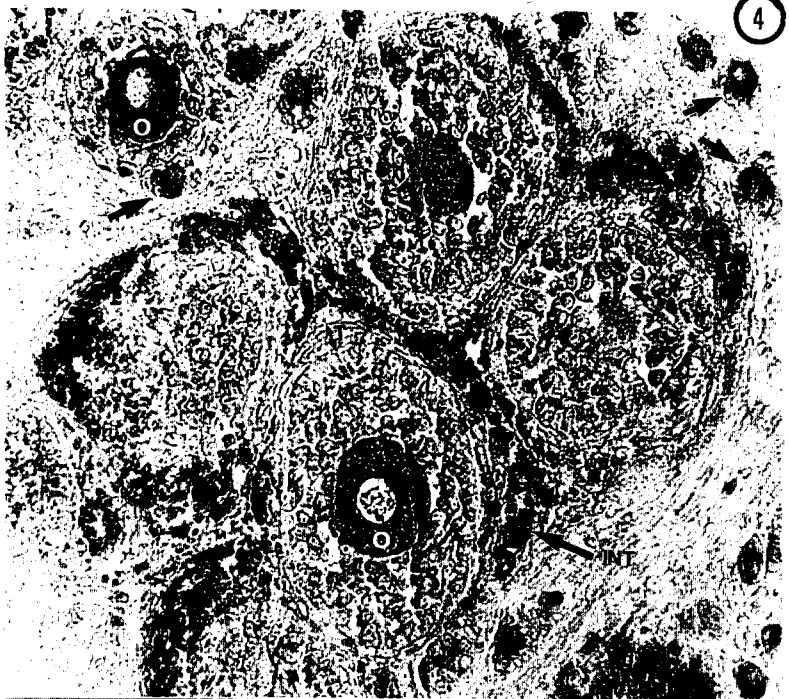
1



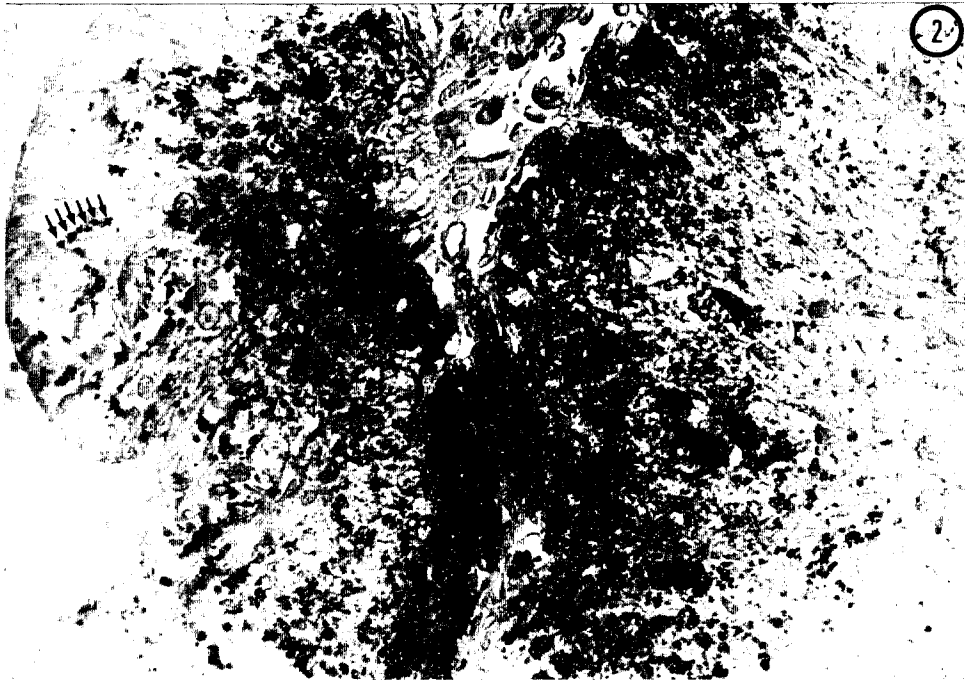
2

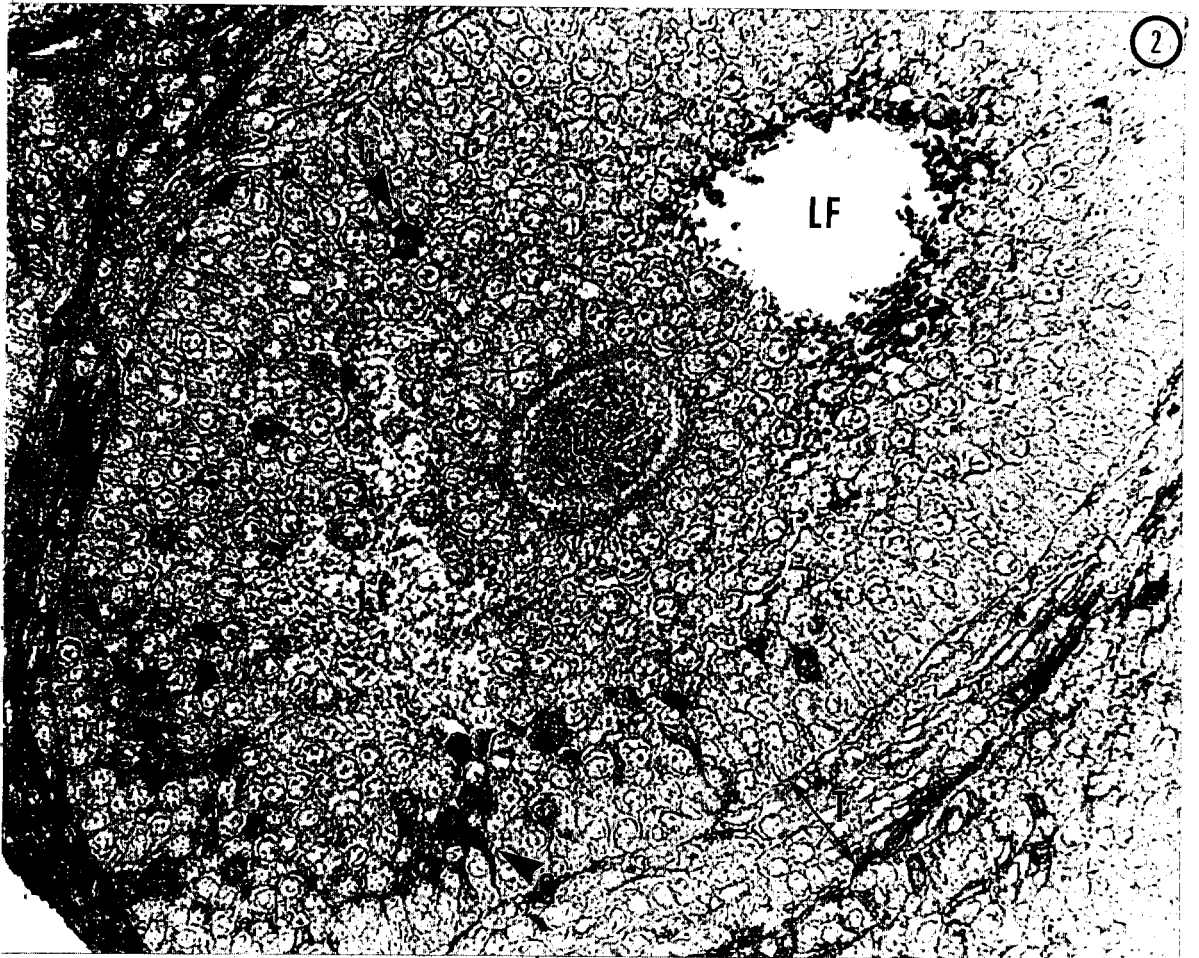
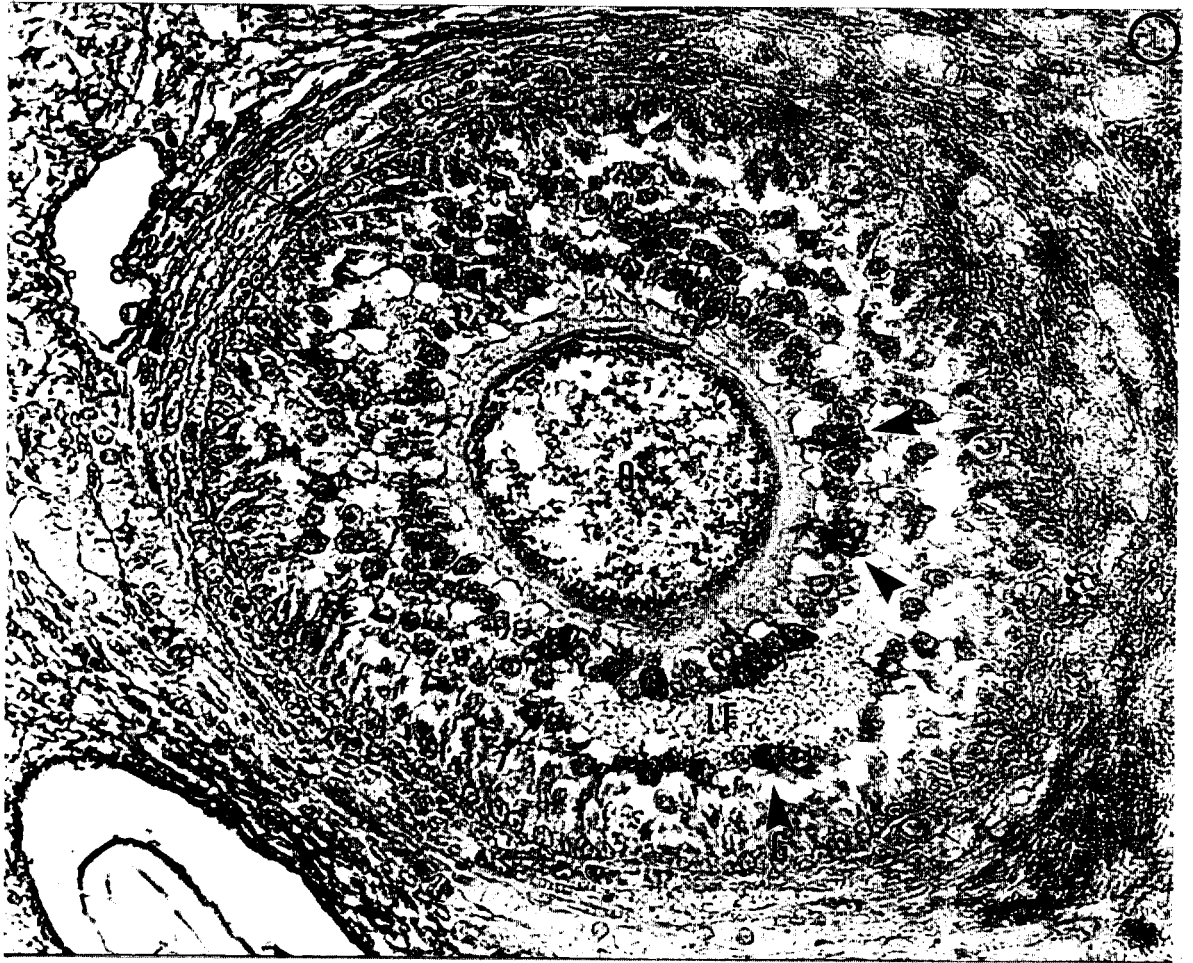


3



4





BIBLIOGRAPHIE

- ADELMAN J.P., MASON A.J., HAYFLICK J.S. and SEEBURG P.H.
Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin releasing inhibiting factor in human and rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 83, 179-183.
- AMSTERDAM A., KNECHT M. and CATT K.J.
Hormonal regulation of cytodifferentiation and intercellular communication in cultured granulosa cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 3000-3004.
- ATEN R.F., WOLIN D.L., and BEHRMAN H.R.
Isolation of a GnRH-like substance from the rat ovary
Endocrinology, 1985, 116 suppl 1, abstr.31.
- ATEN R.F., WILLIAMS A.T. and BEHRMAN H.R., with the technical assistance of D.L. WOLIN
Ovarian GnRH-like protein(s): demonstration and characterization.
Endocrinology, 1987a, 118, 961-967.
- ATEN R.F., IRELAND J.J., WEEMS C.W. and BEHRMAN H.R.
Presence of gonadotropin-releasing hormone like proteins in bovine and ovine ovaries.
Endocrinology, 1987, 120, 1727-1733.
- ATEN R.F., POLAN M.L., BAYLESS R. and BEHRMAN H.R.
A gonadotropin-releasing hormone GnRH-like protein in human ovaries : similarity to the GnRH-like ovarian protein in the rat.
J. Clin. Endocr. Metab. 1987b, 64, 1288-1293.
- ATEN R.F., and BEHRMAN H.R.
A gonadotropin-releasing hormone-binding inhibitor from bovine ovaries.
Purification and identification as histone H2A.
J. Biological Chemistry, 1989a, 264, 11065-11071.
- ATEN R.F. and BEHRMAN H.R.
Antigonadotropic effects of the bovine ovarian gonadotropin releasing hormone binding inhibitor / histone H2A in rat luteal and granulosa cells.
J. Biological Chemistry 1989b, 264, 11072-11075.
- BANKA C.L. and ERICKSON G.F.
Gonadotropin releasing hormone induces classical meiotic maturation in subpopulations of atretic preantral follicles
Endocrinology, 1985, 117, 1500-1507.

- BARAM T., KOCH Y., HAZUM E. and FRIDKIN M.
Gonadotropin-releasing hormone in milk.
Science 1977, 198, 300-301.
- BAUER K. and HORSTHEMKE B.
Degradation of LH-RH. IN : Hormonal control of the hypothalamo-pituitary gonadal axis, edited by K.W.Mc Kerns and Z. Naor, Plenum Press, New York, 1984, 101-104.
- BHASIN S., HERBER D., PETERSON M., SWERDLOFF R.S.
Partial isolation and characterization of a testicular gonadotropin releasing hormone like factors
Endocrinology, 1983, 112, 1144-1146.
- BICSAK T.A., TUCKER E.M., CAPPEL S., VAUGHAN V., RIVIER J., VALE W., HSUEH A.J.W.
Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis.
Endocrinology, 1986, 119, 2711-2719.
- BIRNBAUMER L., SHAHABI N., RIVIER J. and VALE W.
Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary.
Endocrinology 1985, 116, 1367-1370.
- BROWER P., and SCHULTZ R.
Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes : existence and possible nutritional role during oocyte growth.
Dev. Biol. 1982, 90, 144-153.
- BURGUS R., VALE W. and RIVIER J.
Chemistry of hypothalamic releasing factors.
Prog. Brain Res. 1973, 39, 41-51.
- BYSKOV A.G.S.
Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary.
J. Reprod. Fertil. 1974, 37, 277-285.
- CATT K. and TREGGAR G.W.
Solid phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes.
Science, 1967, 158, 1570-1575.
- CLAYTON R.N., HARWOOD J.P. and CATT K.J.
Gonadotropin releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production.
Nature, London, 1979, 282, 90-92.
- CLAYTON R.N. and CATT K.J.
Gonadotropin releasing hormone receptors : characterization physiological regulation and relationship to reproductive function.
Endocr. Rev., 1981, 2, 186-209.

- COOKE B.A., and SULLIVAN M.H.F.
The mechanism of LH-RH agonist action in gonadal tissues
Mol. Cell. Endocrinol. 1985, 41, 115-122.
- CORBIN A. and BEX F.J.
Luteinizing hormone releasing hormone agonists induce
ovulation in hypophysectomized proestrus rat :direct ova-
rian effect.
Life Science 1981, 29, 185-192.
- DALKIN A.C., BOURNE G.A., PIEPER D.R., REGIANI S., and
MARSHALL J.C.
Pituitary and gonadal gonadotropin releasing-releasing
hormone receptors during sexual maturation in the rat.
Endocrinology, 1981, 108; 1658-1664.
- DEKEL N., LEWYSOHN O., AYALON D., and HAZUM E.
Receptors for gonadotropin releasing hormone are present
in rat oocytes.
Endocrinology 1988, 123, 1205-1207.
- DIZEREGA G.S., TONETTA S.A. and WESTMOF G.
A postulated role for naturally occurring avantage
inhibitors in follicle selection.
J. Steroid. Biochem. 1987, 27, 375-383.
- DORRINGTON J.H., Mc KERACHER H.L., CHAN A., and GORE-LANGTON
R.E.
Luteinizing hormone-releasing hormone independently stimula
tes cytodifferentiation of granulosa cells. IN : Hormonal
control of the hypothalamo-pituitary gonadal axis.
Biochemical endocrinology series, Eds. Mc Kerns K.W., and
Naor Z., Plenum New York, 1984, 467-478.
- DUGIMONT J.C.
Techniques immunoenzymatiques appliquées au diagnostic des
affections parasitaires.
Thèse pour le Doctorat d'Etat en Pharmacie, LILLE 1977.
- DUTLOW C.H., MILLAR P.P.
Rat testis immunoreactive LH-RH differs structurally from
hypothalamic LH-RH.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981, 101, 486-494.
- ELKHOLM C., HILLENSJO T. and ISAKSSON O.
Gonadotropin releasing hormone agonist stimulate ovocyte
meiosis and ovulation in hypophysectomied rats.
Endocrinology 1981, 108, 2022-2024.
- ELKIND-HIRSCH K., RAVNIKAR V., SCHIFT I., TULCHINSKI D.,
RYAN K.J.
Determination of endogenous immunoreactive luteinizing
hormone-releasing hormone in human plasma.
J. Clin. Endocr. MetabL, 1982, 54, 602-607.

ENGVALL E.

Enzyme immunoassay E.L.I.S.A. and E.M.I.T.
Methods in Enzymology 1980, 70, 419-439.

ERICKSON G.F., HOFEDITZ C. and HSUEH A.J.W.

Modulation of steroidogenic enzymes by gonadotropin releasing hormone in cultured granulosa cells. IN : Factors regulating ovarian function. Eds. Greenwald G.S. and Terranova P.F., Raven Press, New York 1983, 257-261.

ERICKSON G.F., HOFEDITZ C. and HSUEH A.J.W.

GnRH stimulates meiotic maturation in preantral follicles of hypophysectomized rats. IN : Factors regulating ovarian function". Eds. G.F. Greenwald, P.F. Terranova Raven Press. New York. 1983, p. 257.

ESKAY R.L., MICAL R.S., PORTER J.C.

Relationship between luteinizing hormone releasing hormone concentration in hypophyseal portal blood and luteinizing hormone release in intact, castrated, and electrochemically stimulated rats.
Endocrinology, 1977, 94, 713

FINK G.

Control of the ovarian cycle in the rat. IN : Ovulation in the human. Eds. Crosignani P.G. and Mishell D.R., Academic Press, New York, 1976, 95-114.

FLETCHER W.F.

Intercellular junctions in ovarian follicles : a possible functional role in follicle development. IN : Ovarian follicular development and function. Eds. Midgley A.R. and Sadler W.A., Raven Press, New York, 1979, 113-120.

GRAHAM R.C. and KARNOVSKY M.J.

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultra-structural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 1966, 14, 291-303.

GOUGEON A.

Dynamics of follicular growth in the human : a model from preliminary results.
Human Reproduction 1986, 1, 81-87.

HAGE A.J., GROEN-KLEVANT A.G. and WELSCHEN R.

Follicle growth in the immature rat ovary.
Acta Endocrinol. 1978, 88, 375-382.

HARWOOD J.P., CLAYTON R.N., and CATT K.J.

Ovarian GnRH receptors.
I. Properties and inhibition of luteal cell function.
Endocrinology, 1980a, 107, 407-413.

- HARWOOD J.P., CLAYTON R.N., CHEN T.T., KNOX G., and CATT K.J.
Ovarian GnRH receptors.
II. Regulation and effects on ovarian development.
Endocrinology, 1980b, 107, 414-421.
- HAWKES R., NIDAY E. and GORDON J.
A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies.
Anal. Biochem. 1982, 119, 142-147.
- HEDGER M.P., ROBERTZON D.M., BROWNE C.A., and de KRETZER D.M.
The isolation and measurement of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) from the rat testis.
Mol. Cell. Endocr. 1985, 42, 163-174.
- HILLIER S.G.
Intrafollicular paracrine function of ovarian androgen
J. Steroid Biochem. 1987, 27, 351-357.
- HSUEH A.J.W., and ERICKSON G.F.
Extrapituitary action of GnRH : direct inhibition of ovarian steroidogenesis.
Sciences N.Y., 1979, 204, 854-855.
- HSUEH A.J.W., WANG C. and ERICKSON G.F.
Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon follicle stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor and aromatase activity in rat granulosa cells.
Endocrinology 1980, 106, 1697-1705.
- HSUEH A.J.W., and JONES P.B.G.
Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone.
Endocr. Rev., 1981, 2, 437-461.
- HUANG H.J., ISMIMARU T., YAMABE T.
Demonstration of immunoreactive GnRH in the human ovaries by peroxidase immunocytochemistry.
Asia Oceania. J. Obstet. Gynaecol. 1986, 12, 149-154.
- IRELAND J.J., ATEN R.F., BEHRMAN H.R.
GnRH like proteins in cows : concentrations during corpora lutea development and selective localization in granulosa cells.
Biol. Reprod. 1988, 38, 544-550.
- JAKSON K.L., MELEKA M., CHEN C.L., BAZE F.W.
Immunoreactive GnRH in the pig ovary.
Faseb J., 1989, 3, abst. 3720.

- JOHNSON E.S., GENDRICH R.L., WHITE W.F.
Delay of puberty and inhibition of reproductive processes
in the rat by a gonadotropin-releasing hormone agonist
analog.
Fertil. Steril. 1976, 27, 853-857.
- JONASSEN J.A., and RICHARDS J.S.
Granulosa cell desensitization : effects of gonadotropins
on antral and preantral follicles.
Endocrinology, 1980, 106, 1786-1794.
- JONASSEN J.A., BOSE K., and RICHARDS J.S.
Enhancement and desensitization of hormone responsive adeny-
lylate cyclase in granulosa cells of preantral and antral
ovarian follicles : effects of estradiol and follicle)
stimulating hormone.
Endocrinology, 1982, 111, 74-79.
- JONES Ph.B.C., CONN P.M., MARIAN J., and HSUEH A.J.W.
Binding of gonadotropin releasing hormone agonist to rat
ovarian granulosa cells.
Life Sciences, 1980, 27, 2125-2132.
- JONES Ph.B.C., HSUEH A.J.W.
Modulation of steroidogenic enzymes by gonadotropin-releas-
ing hormone in cultured rat granulosa cells. IN : Factors
Regulating ovarian function, Eds. Greenwald G.S., Terranova
P.F., Raven Press, New York, 1983a, 275-279.
- KASSON B.G., MEIDAN R., DAVOREN J.B., HSUEH A.J.W.
Identification of subpopulations of rat granulosa cells :
Sedimentation properties and hormonal responsiveness.
Endocrinology 1985, 117, 1027.
- KHODR G.S. and SILER KHODR T.M.
Placental luteinizing hormone releasing factor and its
synthesis.
Science 1980, 207, 315-317.
- KLING O.R., ROCHE P.C., CAMPEAU J.D., NISHIMURA K.,
NAKAMURA R.M. and DIZEREGA G.S.
Identification of a porcine follicular fluid fraction
which suppresses follicular response to gonadotrophins
Biol. Reprod. 1984, 30, 564-572.
- KNECHT M., and CATT K.J.
Gonadotropin-releasing hormone : regulation of adenosine
3',5' monophosphate in ovarian granulosa cells.
Sciences, 1981, 214, 1346-1348.
- KNECHT M., KATZ M.S., and CATT K.J.
Gonadotropin releasing hormone inhibits cyclic nucleotide
accumulation in cultured rat granulosa cells.
J. Biol. Biochem., 1981b, 256, 34-36.

- KNECHT M.
INH of granulosa cell differentiation by GnRH.
Endocrinology 1982, 110, 865-872.
- KNECHT M., RANTA T., NAOR Z., and CATT K.J.
Direct effects of GnRH on the ovary. IN : Factors
Regulating Ovarian function. Eds. Greenwald G.S., Terranova
P.F., Ravan Press, New York, 1983, 225-243.
- KNECHT M., RANTA T., FENG P., SHINOMARA O., and CATT K.J.
Gonadotropin-releasing hormone as a modulateur of ovarian
function.
J. Steroid Biochem. 1985, 23, 771-778.
- KOCH Y., ELKABES S. and FRIDKIN M.
Degradation of luteinizing hormone-releasing hormone by
rat pituitary plasma membrane associated enzymes. IN :
Hormonal control fo the hypothalamo-pituitary gonadal axis
eds. K.W. Mc Kerns and Z. Naor, Plenum Press, New York,
1984, 115-126.
- KÖVES K., GOTTSCHALL P.E., and ARIMURA A.
Gonadotropin-releasing hormone binding sites in ovaries
of normal gycling and persistent estrus rats.
Biol. of Reprod. 1989, 41, 505-511.
- KRISHNA A. and SPANEL-BOROWSKI K.
Intercellular detection of albumin in the ovaries of
golden hamsters by light and electron microscopy.
Arch. Histol. Cytol. 1989, 52, 387-393.
- LATOUCHE J., CRUMEYROLLE-ARIAS M., JORDAN D., KOPP N.,
AUGENDRE-FERRANTE B., CEDARD L., HAOUT F.
GnRH receptors in human granulosa cells : anatomical
localization and characterization by autoradiographic study
Endocrinology, 1989, 125, 1739-1741.
- LEDWITZ-RIGBY F.
Local regulation of granulosa cell maturation
J. Steroid Biochem. 1987, 27, 385-391.
- LEDWITZ-RIGBY F., DEMENT-LIEBENOW P.
Direct action of gonadotropin releasing hormone and visua-
lization of its receptors on porcine ovaries. IN : Growth
factors and the ovary. Eds. Hirshfield A.N., Serono Sympo-
sia 1988 U.S.A.
- LEONARDELLI J., BARRY J. et DUBOIS M.P.
Mise en évidence par immunofluorescence d'un constituant
immunologiquement apparenté au LH-RF dans l'hypothalamus
et l'éminence médiane des mammifères.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1973, 276, 2043-2046.

- LIANG S.G., TAKETANI Y., YANO T., and MIZUNO M.
Regulation of aromatase activity by gonadotropin-releasing hormone and its agonists in cultured rat granulosa cells.
Acta Obst. Gynaec. Jpn. 1989, 41, 1725-1730.
- MAGOFFIN D.A., REYNOLDS D.S., and ERIKSON G.F.
Direct inhibitory effect of GnRH on androgen secretion by ovarian interstitial cells.
Endocrinology 1981, 109, 661-663.
- MAGOFFIN D.A., and ERICKSON G.F.
Mechanism by which GnRH inhibits androgen synthesis directly in ovarian interstitial cells.
Molec. Cell. Endocrinol. 1982, 27, 191-198.
- MARCHETTI B., CIONI M., BADR M., FOLLEA N. and PELLETIER G.
Ovarian adrenergic nerves directly participate in the control of luteinizing hormone - releasing hormone and β -adrenergic receptors during puberty : A biochemical and autoradiographic study.
Endocrinology 1987, 121, 219-226.
- MARUO T., OTANI T., MOCHIZUKI M.
Antigonadotropic actions of GnRH agonist on ovarian cells in vivo and in vitro.
J. Steroid Biochem. 1985, 23, 765-770.
- MASSICOTTE J., VEILLEUX R., LAVOIE M., and LABRIE F.
An LH-RH agonist inhibits FSH-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in porcine granulosa cells in culture.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980, 94, 1362-1366.
- NAKANE P.K.
Simultaneous localisation of multiple tissue antigens utilizing the peroxidase labeled antibody method : a study on pituitary glands of the rat.
J. Histochem. Cytochem. 1968, 16, 557-560.
- NAKANO R., MIZUNO T., KAYAMA K. and TOJO S.
Growth of ovarian follicles in the absence of gonadotrophins.
J. Reprod. Fertil. 1975, 45, 545-546.
- NETT T.M., AKBAR A.M., NISWENDER G.D.
Serum levels of luteinizing hormone and gonadotropin releasing hormone in cycling castrated and anestrous ewes.
Endocrinology, 1974, 94, 713-718.
- NIKOLICS K., and SEEBURG P.H.
Gonadotropin-releasing hormone : gene structure, biosynthesis and secretion. IN : International symposium on GnRH and Gonadal peptides. Eds. IPSEN BIOTECH, Paris September 16-17, 1989.

- OIKAWA M., DARGAN C., NY T., and HSUEH A.J.W.
Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin- α -messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 1990, 127, 2350-2356.
- OJEDA S.R., and URBANSKI H.F.
Puberty in the rat. IN : The physiology of reproduction, Eds. Knobil E., and J. Neill, Raven Press Ltd, New York 1988, 1699-1737.
- PELLETIER G., SEQUIN C., DUBE D., and St ARNAUD R.
Distribution of LH-RH receptors in the rat ovary *Biol. Reprod.* 1982, 26, suppl. 1, abstr. 230.
- PIEPER D.R., RICHARDS J.J., and MARSHALL J.C.
Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors : characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology*, 1981, 108, 1148-1155.
- POPKIN R.M., FRASER H.M., and GOSDEN R.G.
Effect of LH-RH agonist or LH-RH immunoneutralization on pituitary and ovarian LH-RH receptors in female rats. *J. Reprod. Fertil.*, 1983, 69, 245-252.
- QUATTROPANI S.L., and WEIZZ J.
Conversion of progesterone to estrone and estradiol in vitro by the ovary of the infantile rat in relation to the development of the intestinal tissue. *Endocrinology*, 1973, 53, 1269-1276.
- RANTA T., KNECHT M., KODY M., and CATT K.J.
GnRH receptors in cultured rat granulosa cells : mediation of the inhibitory and stimulatory actions of GnRH. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982, 27, 233-240.
- RANTA T., BAUKAL A., KNECHT M., KORHONEN M., and CATT K.J.
Inhibitory actions of a gonadotropin-releasing hormone agonist on ovarian follicle stimulating hormone receptors and adenylate cyclase in vitro *Endocrinology*, 1983, 112, 956-964.
- RANTA T., KNECHT M., BAUKAL A.J., KORHONEN M. and CATT K.J.
GnRH agonist induced inhibitory and stimulatory effects during ovarian follicular maturation. *Mol. Cell. Endocr.* 1984, 35, 55-63.
- REEVES J.J., SEGUIN C., LEVEBvre F.A., KELLY P.A., and LABRIE F.
Similar luteinizing hormone release hormone binding sites in rat anterior pituitary and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980, 77, 5567-5571.

- RENAUD R. et ANDRE G.
Le follicule ovarien. (Deuxième rapport)
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 1984, 13, 261-290.
- RIPPEL R.H., and JOHNSON E.S.
Inhibition of hCG induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogs of GnRH.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1976, 152, 432-436.
- SAKAKIBARA H.
Gene expression of gonadotropin releasing hormone in the rat ovary.
Acta Obst. Gynaec. Jpn. 1989, 41, 1817-1822.
- SCHALLY A.V.
Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland.
Science, 1978, 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.
Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971, 43, 393-399.
- SEEBURG P.H., and ADELMAN J.P.
Characterization of cDNA for precursors of human luteinizing hormone releasing hormone.
Nature, 1984, 311, 666-668.
- SHEELA RANI C.S., EKHMOLM C., BULLI G., MAGNUSSON C., and HILLENZJÖ T.
Biphasic effect of gonadotropin releasing hormone on progesterin secretion by rat granulosa cells.
Biol. Reprod. 1983, 28, 591-597.
- SMITH-WHITE S., and OJEDA S.R.
Changes in ovarian LH-RH receptors content during the onset of puberty in the remale rat.
Endocrinology 1981a, 108, 347-349.
- SMITH-WHITE S., and OJEDA S.R.
Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat.
Endocrinology 1981b, 109, 152-161.
- SMITH-WHITE S., and OJEDA S.R.
Peripubertal decline in ovarian LH-RH receptor content characterization and distribution.
Neuroendocrinology 1983, 36, 449-456.

- SMITH-WHITE S., and OJEDA S.R.
Maternal modulation of infantile ovarian development and available ovarian luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) receptors via milk-LH-RH.
Endocrinology 1984, 115, 1973-1983.
- SMITH-WHITE S. and OJEDA S.R.
The peripubertal decline in ovarian LH-RH receptor content : characterization and distribution.
Neuroendocrinology, 1984, 36, 449-456.
- TERNYNCK Th. and AVRAMEAS S.
Techniques immunoenzymatiques. IN : Techniques en immunologie, eds. INSERM 1987
- TOWBIN H., STAEHELIN T., and GORDON J.
Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354.
- TRAMU G.
Détection immunocytologique des polypeptides apparentés à la corticotropine et à la Bêta-lipotropine dans l'adénohypophyse et l'hypothalamus du cobaye et du lérot.
Thèse pour le Doctorat de Sciences LILLE 1980
- TSANG V.C.W., PERALTA J.M. and SIMONS A.R.
Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis.
Methods Enzymol., 1983, 92, 377-391.
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESGHLAG E. and ROSS G.T.
A method for producing antisera with small doses of immunogen.
J. Clin. Endocr. Metab. 1971, 33, 988-991.
- VALENCA M.M., WETSEL W.C., CULLER M.D., NEGRO-VILAR A.
Differential secretion of proLH-RH fragments in response to (K⁺), prostaglandin E₂ and C kinase activation.
Mol. Cell. Endocrinol. 1988, 55, 95-100.
- VANCE V.K., SCHNURE J.J. and REICHLIN M.
Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non steroidogenic polymers of BSA and ACTH. IN : Protein and polypeptide hormones (Eds. M. Margoulies) Int. Congr. Ser. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam, 1968, 161, 380-384.
- WASSARMAN P.
The mammalian ovum. IN : The physiology of reproduction, Eds. Knobil E., and Neill J., Raven press Ltd., New York 1988, 69-102.

WENIGER J.P., and ZEIS A.

Action of LH, FSH and (Bu)₂ cAMP on the conversion of (3H) 19-hydroxyandrostenedione into oestrogens by foetal and infantile rat ovaries in organ culture.
J. Steroid Biochem. 1990, 35, 507-510.

WILLIAMS A.T., and ULMANIS M.A.

Macromolecular bound antigonadotropin in porcine follicular fluid with LH-RH immunoreactivity.
Biol. Reprod. 1983, 28, (Suppl 1) abst 258.

YING S.Y., and GUILLEMIN R.

(D-Trp⁶-Pro⁹-NE⁺) luteinizing hormone releasing factor inhibits follicular development in hypophysectomized rats.
Nature London, 1979, 280, 593-595.

YING S.Y., LING N., BÖHLEN P., and GUILLEMIN R.

Gonadocrinins : peptides in ovarian follicular fluid stimulating the secretion of pituitary gonadotropins.
Endocrinology 1981, 108, 1206-1215.

ZILBERSTEIN M., ZAKUT H. ELI Y., NAOR Z.

Regulation of prostaglandin E, progesterone and cyclic AMP production in ovarian granulosa cells by LH and GnRH agonist : comparative studies.
Endocrinology 1984, 114, 2374-2381.



DAUDIGNON Agnes

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES SUBSTANCES IMMUNOLOGIQUEMENT
APPARENTEES AU LH-RH DANS L'OVAIRE DE QUELQUES MAMMIFERES :
IMPLICATION DANS LA FOLLICULOGENESE.

Résumé de la Thèse

Des facteurs paracrines apparentés au LH-RH ont été mis en évidence dans les gonades de Mammifères : nous avons axé notre étude sur leur détection immunologique. L'anticorps utilisé est spécifique de la région C-terminale du LH-RH natif. La mise au point d'un dosage E.L.I.S.A. compétitif du LH-RH a montré que la séquence épitopique reconnue est commune au LH-RH hypothalamique et gonadique. Il existe de plus une identité immunologique totale des facteurs LH-RH like extraits d'ovaires de rat, de hamster et d'homme. Quatre formes immunoréactives de PM 41 000 Da, 16 000 Da, 8 600 Da et moins de 1 500 Da ont été détectées dans l'ovaire de hamster. Les deux formes de PM 16 000 Da et 8 600 Da possèdent des déterminants antigéniques communs au LH-RH et ont un PM voisin de celui des précurseurs hypothalamiques du LH-RH. La forme de faible PM est plus hydrophobe que le LH-RH natif. L'ontogénie des facteurs LH-RH like chez le rat montre l'existence d'une concentration maximale d'ir LH-RH dans l'ovaire infantile, avec une chute constante de ce taux jusqu'à l'âge adulte. La distribution de l'ir LH-RH dans l'ovaire immature dépend du stade de croissance des follicules : on retrouve une ir LH-RH dans les ovocytes de follicules primordiaux, primaires et secondaires quelque soit l'âge de l'animal. A 10 15 et 20 jours, l'ir LH-RH est présente dans les deux types cellulaires stéroïdogènes en phase impubère : les cellules de la granulosa et les cellules interstitielles. L'ir LH-RH est conservée après 24 h de culture. L'interprétation de ces résultats a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle physiologique de LH-RH like ovarien dans le contrôle de la croissance folliculaire précoce.

MOTS-CLES

Folliculogénèse
Facteur paracrine
LH-RH

Immunohistochimie
Ovaire
E.L.I.S.A.