



Dosage radio-immunologique homologue d'un facteur hypothalamique de stimulation de la fonction gonadotrope hypothysaire de saumon S-Gn-RH

Bernard Breton, A. Motin, Olivier Kah, F. Lemenn, S. Geoffre, G. Precijoux,
P. Chambolle

► To cite this version:

Bernard Breton, A. Motin, Olivier Kah, F. Lemenn, S. Geoffre, et al.. Dosage radio-immunologique homologue d'un facteur hypothalamique de stimulation de la fonction gonadotrope hypothysaire de saumon S-Gn-RH. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1984, 299 (9), pp.383-388. hal-02728611

HAL Id: hal-02728611

<https://hal.inrae.fr/hal-02728611>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

ENDOCRINOLOGIE. — Dosage radio-immunologique homologue d'un facteur hypothalamique de stimulation de la fonction gonadotrope hypophysaire de Saumon s-Gn-RH.

Note de **Bernard Breton, Agnès Motin, Olivier Kah, Françoise Lemenn, Serge Geoffre, Gilles Precigoux et Pascal Chambolle**, présentée par Maurice Fontaine.

Remise le 21 mai 1984, acceptée le 18 juin 1984.

Un dosage radio-immunologique du Gn-RH de Saumon *p*-gly-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly (NH₂) a été développé avec une sensibilité de 7 pg par tube. Le système proposé permet la détection spécifique de substances immunologiquement apparentées au s-Gn-RH dans le cerveau et l'hypophyse de trois poissons téléostéens, mais pas chez un élasmobranche la Roussette. Ces résultats sont discutés et des valeurs de contenu en Gn-RH des tissus sont présentées.

ENDOCRINOLOGY — *Homologous Radioimmunoassay for Salmon Gonadotropin Releasing Hormone s-Gn-RH.*

A radioimmunoassay for Salmon Gn-RH (p-gly-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly) (NH₂) has been developed with a sensitivity of 7 pg/assay tube. The system allows the specific detection of an immunological GnRH related substance in the brain and pituitary of three teleost species but not in an elasmobranch the Dogfish. These results are discussed and some Gn-RH contents of the organs are proposed.

Bien que l'utilisation d'anticorps dirigés contre le LH-RH mammalien ait permis la mise en évidence immunocytochimique des fibres neurosecrétrices à Gn-RH dans de nombreuses espèces de Poissons, [1] revue de Peter [2], les communautés antigéniques entre LH-RH et Gn-RH de Poissons n'apparaissent pas toujours suffisantes pour développer des méthodes de dosage radio-immunologique de ce facteur chez les Poissons téléostéens ([3], [4]). Cependant des dosages ont été développés pour la mesure d'un facteur immunologiquement apparenté au LH-RH dans l'hypothalamus de tilapia [5] et dans diverses régions du cerveau et l'hypophyse de l'Anguille [6] à partir d'anticorps ne reconnaissant que les séquences 1.7 du décapeptide. Ces systèmes ne peuvent être appliqués aux Salmonidés (Breton et Motin données non publiées). Nous avons donc cherché à développer un système de dosage homologue dans cette espèce, à partir d'un Gn-RH de Saumon synthétisé d'après la formule du décapeptide publiée par Sherwood et coll. [7].

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — 1. *Synthèse du Gn-RH.* — Le peptide *p*-gly-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly (NH₂) a été synthétisé en utilisant la méthode en phase solide de Merrifield [8]. La synthèse a été effectuée sur appareil automatique mis au point au laboratoire de cristallographie de l'Université de Bordeaux-I (LA/44). Le principe de fixation de chaque acide aminé comprend la déprotection par l'acide trifluoro-acétique à 30 %, la neutralisation avec 10 % de diisopropyléthylamine dans CH₂-Cl₂ et le couplage en utilisant le dicyclohexyl-carbodiimide [9]. Le produit brut a d'abord été purifié par perméation de gel (colonne de sephadex G-15 150 × 2,5 cm équilibrée en acide acétique 0,1 M), puis par chromatographie HPLC en phase inverse avec un mélange méthanol eau-acide trifluoro-acétique (50-50-0,1) comme phase mobile. L'analyse de la composition du peptide après hydrolyse HCl 6 N 20 h à 110°C a été effectuée sur auto-analyseur « Technicon TMS » et donne les résultats suivants : glu 0,92; His 0,87; Ser 0,85; Tyr 1,01; gly 2,25; Leu 1,05; Pro 0,91.

2. *Préparation des anticorps.* — Elle a été faite sur Lapin. L'immunogène est préparé par couplage du s-Gn-RH à de l'albumine bovine en présence de glutaraldéhyde [10]. Chaque injection d'immunogène correspond à 400 µg de Gn-RH. Les quatre premières injections espacées de 8 jours sont faites par voie intradermique multipoints. La suivante emprunte la voie intraveineuse 3 semaines plus tard. L'immunisation est complétée par une injection intradermique 15 jours après. Toutes sont faites avec adjuvant complet de Freund. L'anticorps utilisé dans ce travail l'a été au 1/40 000 en dilution finale (B/B_{max} = 50 %).

3. *Préparation du Gn-RH iodé.* — Elle est faite selon la technique de Greenwood et coll. modifiée par Caraty [11]. 5 µg de GnRH dissous dans 5 µl de Tampon Phosphate 0,025 M pH 7,5 sont mis en contact avec 500 µCi d'¹²⁵I Na (IMS 30 Amersham) en présence de 5 µg de chloramine T. L'oxydation est arrêtée au bout de

30 s par addition de 50 µg de métabisulfite de sodium puis de 500 µg de KI. La séparation du Gn-RH et de l'iode libre est faite sur une colonne de LH-20 (0,6 × 20 cm) par un mélange butanol-acide acétique-eau (40/4/8) les fractions présentant les radioactivités les plus élevées sont évaporées sous courant d'azote, et diluées dans 200 µl de tampon Tris-glycine 0,1 M pH 8,9. Les activités spécifiques sont comprises entre 60 et 72 µCi/µg de Gn-RH. La purification du traceur est poursuivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % en tampon Tris-glycine 0,1 M pH 8,9 pendant 4 h (2,5 mA par tube). Après migration les gels sont congelés et découpés en tranches de 2 mm d'épaisseur. Chaque tranche est reprise dans 500 µl de tampon véronal 0,025 M, pH 8,6 contenant 2,5 % de sérum albumine bovine, et broyée dans un homogénéiseur verre teflon. Après 2 h à 4°C la suspension est centrifugée 30 mn à 2 500 g et 4°C, le surnageant est stocké à 0°C. Les récupérations moyennes de matériel radioactif sont d'environ 50 %. Toutes les fractions sont éprouvées par leur capacité de liaison à l'anticorps. Seule la meilleure est retenue pour le dosage.

4. *Dosage.* — Il est réalisé en tampon véronal dans un volume final de 500 µl. L'anti Gn-RH est utilisé dilué dans ce tampon contenant 1 % de sérum de Lapin. L'incubation dure 3 jours à 4°C. La séparation des formes libre et liée est faite par précipitation 4 h à température du laboratoire à l'aide de 200 µl de sérum de Mouton anti γ globulines de Lapin dilué au 1/5 dans du polyéthylène glycol à 15 %. Après centrifugation et élimination des surnageants, les précipités sont comptés dans un compteur autogamma « Packard ».

5. *Préparation des extraits.* — Les cerveaux et hypophyses de Truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri*, Carassin *Carassius auratus*, Sole *Solea solea* et Roussette *Scyliorhinus canicula* sont broyés dans HCl 0,1 N à l'aide d'un homogénéiseur verre-teflon. Pour la Roussette l'hypophyse a été séparée en lobes proximal et ventral qui ont été extraits séparément, des séparations du cerveau de Carassin en hypothalamus, télé-encéphale, toit optique-thalamus et cerveau postérieur ont également été faites. Après centrifugation, les surnageants sont neutralisés par NaOH. N. Un extrait témoin a été préparé dans les mêmes conditions à partir de muscle de Truite.

6. *Analyse des résultats.* — Les comparaisons des courbes de compétition obtenues en présence de Gn-RH, LH-RH, D Ala⁶ Des Gly¹⁰LH-RH (LH-RHa) et les extraits tissulaires sont faites par analyse de covariance des courbes logit B/Bo-logdose.

RÉSULTATS. — Après séparation sur LH-20, l'électrophorèse améliore très sensiblement la liaison du Gn-RH I¹²⁵ à l'anticorps, ainsi que le montre le tableau suivant.

Fraction éluee sur LH-20 n°	5	6	7	8
Liaison avant électrophorèse (%)	55,2	68,7	64,3	56,2
Liaison après électrophorèse (%)	69,3	82,3	72,9	69,8

La sensibilité est de 7 pg de Gn-RH par tube. Les courbes de compétition de la liaison du Gn-RH I¹²⁵ à l'anti Gn-RH par le Gn-RH, le LH-RH, le LH-RHa et les différents extraits hypophysaires et hypothalamiques sont représentées sur la figure 1, le tableau I en donne les pentes. La courbe de déplacement induite par le LH-RH n'est pas parallèle à celle obtenue en présence de Gn-RH, et la sensibilité de détection du LH-RH est plus

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Courbes I¹²⁵I à un immunosérum anti Gn-RH par : Gn-RH ● — ●; LH-RH — — —; LH-RHa □ — □; cerveau de Truite ○ — ○; LH-RH de Truite ▼ — ▼; cerveau de Carassin — — —; hypophyse de Carassin ∇ — ∇; cerveau de Sole — — —; cerveau de Roussette * — *; lobe proximal de l'hypophyse de Roussette * — *.

Competition curves of the binding of I¹²⁵I Gn-RH to its specific antibody by: Gn-RH ● — ●; LH-RH — — —; LH-RHa □ — □; Trout pituitary ▼ — ▼; Trout brain ○ — ○; Goldfish pituitary ∇ — ∇; Goldfish brain — — —; Sole brain — — —; Dogfish brain * — *; Dogfish pituitary proximal lobe * — *.

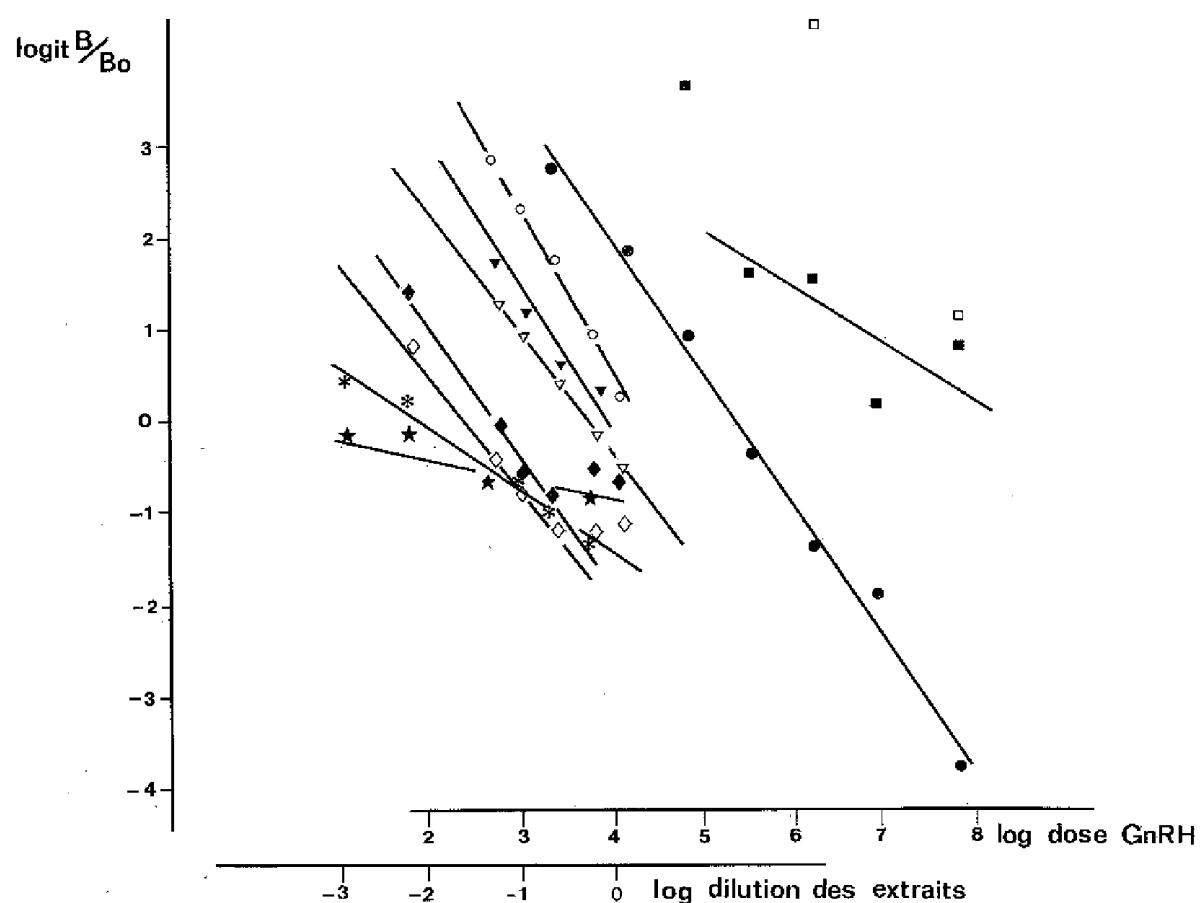


Fig. 1

TABEAU

Produits	Pente (nombre de points)	Parallélisme par rapport au Gn-RH
Gn-RH	-1,47 (7)	
LH-RH	-0,94 (5)	
LH-RH (a)	(2)	
Cerveau de Truite	-1,38 (5)	$p > 0.1$
Hypophyse de Truite	-1,69 (5)	$p > 0.25$
Cerveau de Carassin	-1,48 (4) - 0,11 (5)	$p > 0.1$
Hypophyse de Carassin	-1,29 (5)	$p > 0.1$
Cerveau de Sole	-1,22 (4) - 0,11 (3)	$p < 0.25$
Hypophyse de Sole	Indéetectable	
Cerveau de Roussette	-0,235 (6)	
Hypophyse de Roussette (lobe proximal)	-0,625 (7)	
Hypophyse de Roussette (lobe ventral)	Indéetectable	
Muscle de Truite	Indéetectable	

faible que pour le Gn-RH. Le système ne paraît donc pas reconnaître de la même manière ces deux molécules. Avec le LH-RH, la liaison du s-Gn-RH¹²⁵I à l'anti Gn-RH n'est déplacée qu'aux deux plus fortes concentrations utilisées. Ces deux points ne permettent pas la détermination des paramètres de la courbe de compétition induite par ce facteur. Tous les extraits de cerveaux et d'hypophyses de Téléostéens, à l'exception de l'hypophyse de Sole dans laquelle on ne peut détecter de matériel immunoréactif, déplacent la liaison et les courbes d'inhibition obtenues après transformation logit. Log, sont parallèles à celle produite par le s-Gn-RH, indiquant au Gn-RH une spécificité de reconnaissance d'un matériel immunologiquement apparenté. Les cerveaux de Sole et de Carassin donnent des courbes de compétition qui peuvent être décomposées en deux parties, l'une à pente non statistiquement différente de celle de la droite de référence (Gn-RH) et l'autre à pente très différente, correspondant sans doute à des valeurs aspécifiques liées à de fortes concentrations protéiques (1 cerveau/2 ml). Les quantités de Gn-RH contenues dans les cerveaux sont les suivantes : Truite 2,18-5,62 ng; Carassin 12,14-9,75 ng; Sole 9,89 et les charges hypophysaires : Truite 0,672-1,73-1,55 ng Carassin 7,76-3,26 ng; Sole indétectable. Dans tous les cas les charges hypophysaires sont plus faibles que celles des cerveaux. Les mesures réalisées dans les diverses aires cérébrales du Carassin montrent que le télencéphale (lobes olfactifs non compris) et l'hypothalamus sont les régions les plus riches en Gn-RH.

Chez la Roussette, les courbes de compétitions induites par les extraits de cerveau et du lobe proximal de l'hypophyse ne sont pas parallèles à celle obtenue avec le Gn-RH. Aucun matériel n'est détecté dans le lobe ventral.

DISCUSSION. — Ces résultats confirment la spécificité immunologique existant entre Gn-RH mammalien et de Poissons. Au contraire il ne paraît pas y avoir de spécificité à l'intérieur du groupe des Téléostéens. Un facteur immunoréactif vis-à-vis d'un anticorps anti s-Gn-RH est détecté dans le complexe hypothalamo-hypophysaire de la Roussette confirmant l'existence d'une « releasing » hormone dans cette espèce [12]. Cependant ce facteur présente des différences immunologiques avec le s-Gn-RH laissant supposer des différences structurales entre Gn-RH de Téléostéens et élasmobranches, comme leurs immunoréactivités vis-à-vis d'un anti-LH-RH pouvaient déjà le faire entrevoir [5]. Dans les espèces de Téléostéens étudiées, comme chez l'Anguille [6], le matériel immunoréactif est retrouvé en proportions comparables dans l'hypophyse et le cerveau; résultats en accord avec l'anatomie du complexe hypothalamo-hypophysaire des Téléostéens chez lesquels les projections originaires de l'hypothalamus se terminent en majorité dans la neurohypophyse en étroite intrication avec l'adénohypophyse, qui pourrait représenter l'équivalent physiologique de l'eminence médiane des Mammifères. Au contraire, aucun matériel immunoréactif n'est décelé dans le lobe ventral gonadotrope de la Roussette qui, parfaitement individualisé, n'a apparemment pas de connexion nerveuse et vasculaire avec le lobe proximal et le cerveau [13].

Les quantités de Gn-RH trouvées dans l'hypophyse et le cerveau diffèrent selon les espèces et sont plus élevées chez les Cyprinidés que chez les Salmonidés, constatation à rapprocher des observations immunocytochimiques réalisées à l'aide d'immunserums anti LH-RH. La quantité de matériel immunoréactif détectée chez le Carassin paraît beaucoup plus importante que chez la Truite ([2], [14]).

En conclusion, nous avons développé un système de dosage radio-immunologique qui paraît applicable à la mesure du Gn-RH dans le système nerveux central et l'hypophyse de diverses espèces de Poissons téléostéens. Des résultats préliminaires montrent que les

immunsérums réalisés sont également utilisables pour la localisation immunocytochimique du Gn-RH dans le cerveau. La validation du dosage pour la mesure du Gn-RH dans le plasma reste à faire, mais en raison des particularités anatomiques du système hypothalamo-hypophysaire des Téléostéens, la réalisation de mesures à partir de sang porte telles que celles effectuées chez les Mammifères [11] paraît problématique ou du moins pourra-t-on se poser la question de la signification physiologique des niveaux de Gn-RH dans la circulation périphérique.

Nous exprimons notre gratitude à MM. les Docteurs Caraty et Dubois pour leurs précieux conseils, ainsi qu'au Docteur T. Hombrados de l'Université de Bordeaux-II pour l'analyse en acides aminés. Ce travail a bénéficié de l'aide de l'I.N.R.A. et du C.N.R.S.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. E. PETER, *Amer. Zool.*, 23, 1983, p. 685-695.
- [2] O. KAH, P. CHAMBOLLE, P. DUBOURG et M. P. DUBOIS, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53, 1984, p. 107-115.
- [3] R. J. DERRY, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 24, 1984, p. 280-285.
- [4] J. A. KING et R. P. MILLAR, *Science*, 206, 1979, p. 67-69.
- [5] J. A. KING et R. P. MILLAR, *Endocrinology*, 106, 1980, p. 707-717.
- [6] S. DUFOUT, C. PASQUALINI, B. KERDELHUE et Y. A. FONTAINE, *Neuropeptides*, 3, 1982, p. 159-171.
- [7] N. SHERWOOD, L. EIDEN, M. BROWNSTEIN, J. SPEISS, J. RIVIER et W. VALE, *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 80, 1983, p. 2794-2798.
- [8] R. B. MERRIFIELD, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 1984, p. 2149.
- [9] J. C. SHECHAN et G. P. MESS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, p. 1067-1072.
- [10] M. P. DUBOIS, *Ann. Histochem.*, 21, 1976, p. 269-278.
- [11] A. CARATY, M. M. DE REVIÉ, J. PELLETIER et M. P. DUBOIS, *Reprod. Nutr. Develop.*, 20, 1980, p. 1489-1501.
- [12] J. W. CRIM, W. W. DICKHOFF et A. GORBMAN, *Amer. Zool.*, 18, 1978, p. 411-424.
- [13] A. JASINSKI, *Gen. Comp. Endocrinol.*, Suppl. 3, 1969, p. 510-521.
- [14] M. P. DUBOIS, R. BILLARD, B. BRETON et R. E. PETER, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37, 1979, p. 220-232.

B. B. et A. M. : Laboratoire de Physiologie des Poissons,
I.N.R.A., campus de Beaulieu, 35042 Rennes,

O. K. et P. C. : Laboratoire de Biologie animale,
Université de Bordeaux-I, 33405 Talence;

F. L. : Laboratoire de Biologie marine,
Université de Bordeaux-I, 33405 Talence.

S. G. et G. P. : Laboratoire de Cristallographie et de Physique cristalline,
Université de Bordeaux-I, 33405 Talence.