

Dosage radioimmunologique de l'hormone placentaire somatotrope et mammotrope bovine (*) (**)

J.F. BECKERS, R. DE COSTER, P. WOUTERS-BALLMAN,
Ch. FROMONT-LIENARD, P. VAN DER ZWALMEN, F. ECTORS

*Chaire d'Obstétrique et des Troubles de la Reproduction
Rue des Vétérinaires 45, B-1070 Bruxelles*

RESUME

L'immunisation de lapins au moyen d'une préparation de HPSM hautement purifiée a permis d'obtenir des antisérums très spécifiques et de mettre au point un dosage radioimmunologique sensible.

Dans les extraits de cotylédons et dans le sérum foetal, les teneurs déterminées par cette méthode concordent parfaitement avec celles déterminées par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires de lapine.

Dans les sérums de vaches gestantes, la HPSM est toujours présente dès le 110^e jour après la fécondation mais la concentration n'est presque jamais supérieure à 2 ng/ml.

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, nous avons mis au point une méthode d'isolement de l'Hormone Placentaire Somato-

trope et Mammotrope (H.P.S.M.) à partir de cotylédons foetaux de bovins (Beckers et coll.; 1980). Les caractéristiques de la liaison aux récepteurs membranaires des organes cibles apparentent

(*) Ces recherches ont été subsidiées par l'I.R.S.I.A., rue de Crayer 6, B - 1050 Bruxelles.

(**) Cette hormone est également connue sous le nom de « Bovine Placental Lactogen (bPL) » ou « Bovine Chorionic Somatomamotropin (bCS). Nous préférons l'appellation « Hormone Placentaire Somatotrope et Mammotrope » (HPSM) qui exprime la dualité de l'activité hormonale.

cette hormone à l'hormone de croissance et à la prolactine. C'est ainsi que récemment, nous avons pu mettre au point deux méthodes de dosages de la HPSM par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires hépatiques et mammaires de lapines gestantes. (Beckers et Ectors ; 1981). Cette technique est particulièrement bien adaptée au dosage de l'hormone dans les extraits de cotylédons et dans les fractions obtenues au cours des différentes étapes de la purification. Mais étant donné l'interférence éventuelle de la prolactine, de l'hormone de croissance et des protéines sériques, la méthode ne permet pas la détermination des taux sériques de la HPSM. Par conséquent, nous avons tenté de mettre au point un dosage radioimmunologique.

MATERIEL ET METHODES

1) Production des antisérums anti-HPSM

Douze lapins et six cobayes ont été immunisés au moyen de la HPSM purifiée. Les injections ont été pratiquées par voie intradermique selon la méthode de Vaitukaitis et coll. (1971).

Les lapins ont reçu par séance 100 à 200 μg d'hormone diluée dans 1 ml de tampon phosphate sodico-potassique 0,05 M ajusté à pH 7,5 ; chlorure de sodium 0,15 M. L'adjuvant complet de Freund était ajouté à raison de 0,5 à 1 ml par lapin.

Les cobayes ont reçu 100 μg de HPSM diluée dans 0,25 ml de tampon et additionnée de 0,25 ml d'adjuvant incomplet de Freund.

Les immunisations ont été répétées tous les 15 à 20 jours pendant au moins 5 mois.

Des saignées mensuelles de 50 à 75 ml chez le lapin et de 1 à 5 ml chez le cobaye ont été réalisées à la veine de l'oreille à

partir du 3^e mois suivant la première immunisation.

2) Marquage de la HPSM à l'iode 125.

Le marquage de la HPSM à l'iode 125 suivant la méthode à la lactoperoxydase de Thorøll et Johansson (1971) a été réalisé dans la proportion de 2,5 μg d'hormone pour 1 milliCurie.

3) Détermination de la radioactivité spécifique de l'hormone marquée.

La radioactivité spécifique d'une hormone marquée peut être déterminée en comparant la courbe d'inhibition obtenue par l'addition d'hormone froide en quantité croissante (courbe standard) à la courbe de saturation c'est-à-dire la courbe d'inhibition progressive de la liaison obtenue en utilisant des quantités croissantes d'hormone marquée au lieu d'hormone froide.

Cette méthode a été décrite en radioimmunologie par Gocke et coll. (1969) ; Hunter (1971) et Roulston (1979) et adaptée par Ketelslegers et coll. (1974) aux dosages par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires.

4) Séparation des fractions libre et liée.

Au cours du dosage, les fractions libre et liée ont été séparées par l'addition d'un second antisérum anti- γ -globulines couplé à de la cellulose.

L'antisérum anti- γ -globulines de lapin a été produit sur mouton immunisé au moyen de γ -globulines purifiées selon la méthode de Harboe et Ingild (1973) tandis que l'antisérum- γ -globulines de cobaye a été obtenu sur lapin.

Dans les deux cas, les γ -globulines des sérums obtenus ont été précipitées au sulfate de soude selon la méthode de Kekwick (1940) puis couplées à de la cellulose microcristalline activée au bromure de cyanogène selon la technique d'Axen et coll. (1967).

5) Conditions du dosage

- Le dosage est réalisé dans des tubes de cristal de polystyrène de dimensions 13 × 70 mm.
- Un tampon Tris-HCl 0,025 M ; MgCl₂ 0,010 M ; pH 7,6 ; 0,1 % BSA. (fraction V de Cohn) ; 0,01 % de sulfate de néomycine est utilisé pour toutes les dilutions.
- L'échantillon à doser (standard de référence, sérum ou extrait de placenta) est additionné à raison de 100 ou 200 µl.
- La quantité d'hormone marquée ajoutée au milieu équivaut à 15 000 cpm, l'antisérum 286 est utilisé à la dilution finale de 1/300 000 et le volume d'incubation est en général de 500 µl.
- L'antisérum anti-γ-globulines de lapin couplé à la cellulose ajouté à raison de 1 ml de suspension correspondant à ≈ 2 mg de cellulose est incubé pendant 16 heures à 4 °C. (2^e incubation).
- Pour augmenter la sensibilité du dosage, les conditions les plus favorables ont été précisées en ajoutant les réactifs par étapes successives.

Tous nos dosages ont été réalisés suivant l'un des trois schémas suivants :

1^{re} méthode : Dosage réalisé en présence de 100 µl de sérum

Incubation	16 à 24 heures à 4 °C
2 ^e incubation	16 heures à 4 °C

2^e méthode : Dosage réalisé en présence de 100 µl de sérum

Préincubation	16 heures à 4 °C
Incubation	8 heures à 4 °C
2 ^e incubation	16 heures à 4 °C

3^e méthode : Dosage réalisé en présence de 100 µl de sérum en préincubant l'hormone froide avec l'antisérum concentré

- 500 µl de sérum
- addition de 100 µl d'antisérum 5 fois plus concentré que la concentration d'équilibre
- préincubation : 16 heures à 4 °C
- dilution pour amener le volume d'incubation à 2 ml

- reprise de 400 µl de chaque tube et addition de 100 µl de HPSM marquée
- incubation : 8 heures à 4 °C
- addition de la cellulose anti-γ-globulines
- 2^e incubation : 16 heures à 4 °C

Les résultats ont été analysés à l'aide de programmes développés par Rodbard et Lewald (1970) ; Rodbard (1971), Rodbard et Frazier (1973) et Rodbard (1974) *.

RESULTATS

A. Hormone marquée

La liaison spécifique de la HPSM marquée à l'antisérum présent en excès dans le milieu est de 95 %, la liaison non spécifique est faible, toujours inférieure à 2 %.

Lorsque le dosage est réalisé selon la méthode 1, une inhibition de 50 % de la liaison est obtenue avec 270 pg d'hormone froide (courbe d'inhibition) et 125.000 cpm d'hormone marquée (courbe de saturation) (Fig. 1) permettant d'estimer à 450.000 cpm par ng la radioactivité spécifique de l'hormone marquée.

B. Antisérums

1) Antisérums obtenus par immunisation de cobayes.

Les 6 cobayes (3 mâles, 3 femelles) immunisés au moyen de l'hormone purifiée ont tous survécu aux injections, il est en outre intéressant de signaler que durant la période d'immunisation les 3 femelles ont mené à bien une gestation et ont élevé leurs petits sans aucun problème.

* Le traitement des résultats est réalisé dans le laboratoire du Professeur G. Hennen, Section d'endocrinologie - Institut de Médecine - Université de Liège.

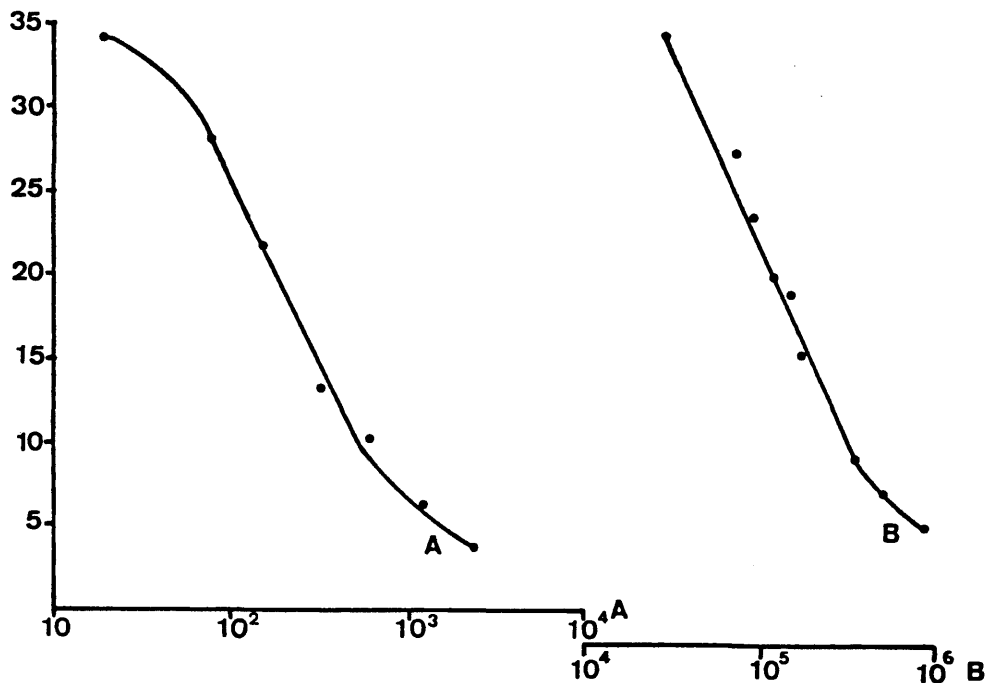


Fig. 1. — Détermination de la radioactivité spécifique de l'hormone marquée.

Conditions : Dosage radioimmunologique suivant la méthode 1.

En abscisse : (échelle logarithmique)

A. Quantité d'hormone froide, en pg par tube

B. Quantité d'hormone marquée, en cpm par tube

En ordonnée : (échelle linéaire) $(B/T) \times 100$

Hormone marquée liée spécifiquement aux anticorps (B) par rapport à la radioactivité totale ajoutée au milieu (T) (en pourcentage).

A. : Courbe d'inhibition de la liaison par l'hormone froide

B. : Courbe de saturation de la liaison par l'hormone marquée.

Les antisérums obtenus présentent les titres suivants : 1/5.000, 1/20.000, 1/40.000, 1/80.000, 1/150.000 et 1/200.000.

La sensibilité des courbes d'inhibition obtenues avec ces antisérums est restée constamment inférieure à celle obtenue avec les antisérums produits sur lapin.

2) *Antisérums obtenus par immunisation de lapins.*

Les 12 lapins immunisés ont fourni des antisérums pouvant être utilisés aux dilutions finales suivantes : 1/30.000 ; 1/40.000 ; 1/50.000 ; 1/60.000 ; 1/80.000 ; 1/90.000 ; 1/100.000 ; 1/150.000 ; 1/300.000 ; 1/400.000 ; 1/500.000 ; 1/600.000.

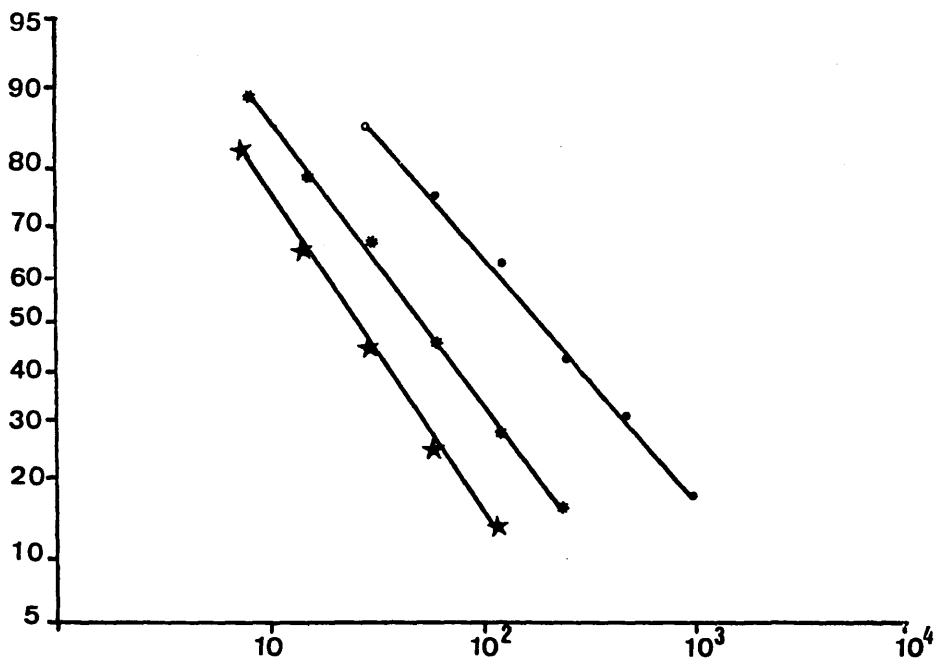


Fig. 2. — Dosage radioimmunologique de la HPSM. Courbes d'inhibition de la liaison de la HPSM-I 125 à l'antisérum en fonction de la méthode utilisée.

Conditions : Dosages réalisés suivant les méthodes 1, 2 et 3.

En abscisse : (échelle logarithmique)

Quantité de HPSM froide additionnée au milieu, exprimée en pg par tube.

En ordonnée : (échelle logit) $B/Bo \times 100$

HPSM radioactive liée spécifiquement aux anticorps (B) par rapport à la liaison en absence d'hormone froide (Bo) Logit $(B/Bo) = \ln [(B/Bo)/(1-B/Bo)]$

Méthode	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 %	Quantité minimale détectable
1 ●	$-0,86 \pm 0,29$	$186,1 \pm 5,15$ pg	9,52 pg
2 *	$-1,06 \pm 0,05$	$48,1 \pm 1,17$ pg	6,4 pg
3 ★	$-1,46 \pm 0,06$	$27 \pm 0,55$ pg	5,06 pg

C. Qualité du dosage

La figure 2 représente les courbes d'inhibition de la liaison de la HPSM radioactive aux anticorps par l'hormone froide.

Pour nos dosages, nous avons généralement adopté les conditions permettant la meilleure sensibilité, c'est-à-dire en préincubant l'hormone froide et l'antisérum concentré.

La spécificité du dosage radioimmunologique de la HPSM est parfaite en ce

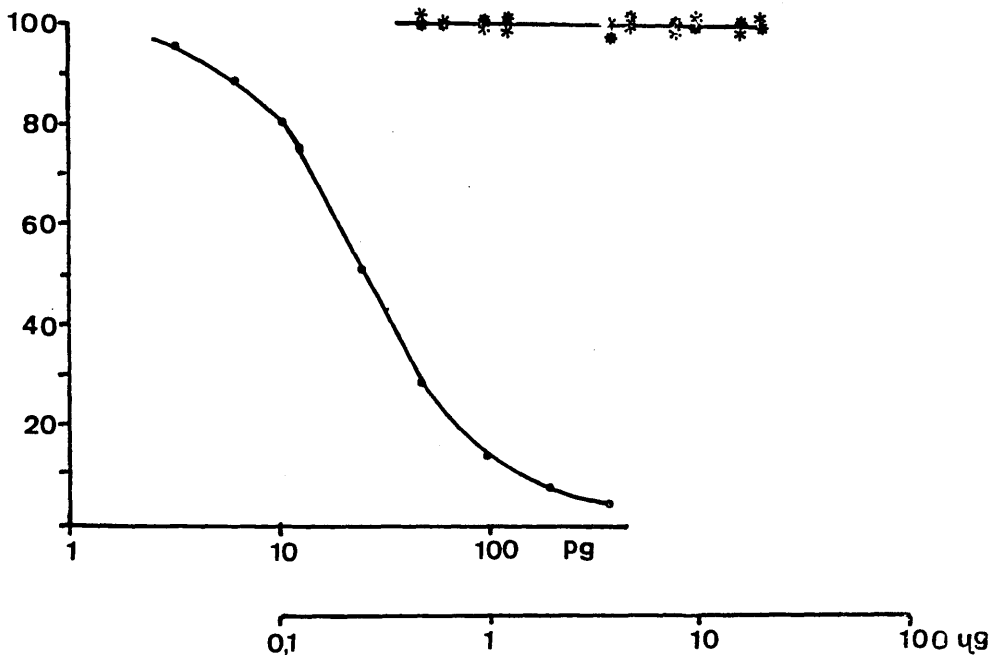


Fig. 3. — Spécificité du dosage radioimmunologique de la HPSM.

Conditions : méthode 3.

● HPSM

* bGH-NIH-B18

✱ bPRL-NIH-B4

En abscisse : (échelle logarithmique)

Quantité d'hormone froide additionnée au milieu exprimée en pg ou en µg par tube

En ordonnée : (échelle linéaire) $B/Bo \times 100$

HPSM radioactive liée spécifiquement aux anticorps (B) par rapport à la quantité liée en absence d'hormone froide (Bo) (en pourcentage).

qui concerne la prolactine* et l'hormone de croissance*, la présence de 25 µg de ces hormones ne produit absolument aucune diminution de la liaison de la HPSM radioactive aux anticorps (Fig. 3).

* Nous remercions le « National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases » Bethesda-Maryland et le « College of American Pathologists » qui nous ont aimablement fourni la prolactine bovine PRL-NIH-B4 (18,5 U/mg), l'hormone de croissance bovine GH-NIH-B18 (0,85 U/ml) et la prolactine ovine NIH-S8.

D. Résultats des dosages de la HPSM

Les concentrations de la HPSM ont été mesurées dans les extraits de cotylédons foetaux et maternels, dans le liquide amniotique et allantoïdien, dans le sérum foetal et maternel.

1) Dosage de la HPSM dans les extraits de cotylédons

Les extraits de cotylédons sont relativement riches en hormone de sorte qu'il

TABLEAU 1. — Teneurs en H.P.S.M. des cotylédons foetaux et maternels exprimées en mg par kg de tissu *.

	Dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires		Dosage radioimmuno- logique **
	a. hépatiques **	b. mammaires **	
Cotyl.			
foet.	1. 32,2	37,5	33,7
	2. 23,2	21	23,7
	3. 11,5	14,2	13
	4. 39	39,2	41
	5. 12,5	14,1	17
Cotyl.			
mater.	6. 7,5	7	7,8
	7. 5,1	4,8	4,5
	8. 4,5	3,9	4,5
	9. 8	6,75	9
	10. 8	8,75	12

* Les cotylédons ont été broyés environ 1 minute au moyen d'un mixer de ménage et extraits en tampon glycine 0,05 M ajusté à pH 7,5 au moyen d'hydroxyde de sodium ; chlorure de sodium 0,15 M.

L'extraction a été réalisée dans un rapport poids de tissu/volume de tampon de 1/5, et poursuivie pendant une heure à la température de 4 °C, ensuite la solution a été clarifiée par centrifugation à 13 000 g. pendant 40 minutes à 4 °C. Les résultats sont exprimés en mg de H.P.S.M. par kg de cotylédons frais.

** L'analyse de variance ne révèle aucune différence significative entre les 3 méthodes de dosage.

est possible de réaliser valablement les dosages par la méthode radioimmunologique et par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires.

Le tableau 1 permet de comparer les résultats des dosages par ces différentes méthodes.

2) Dosage de la HPSM dans les liquides amniotiques et allantoïdiens.

Nous avons réalisé une série de dosages de la HPSM dans les liquides allantoïdiens et amniotiques, simultanément nous avons dosé les protéines totales par la méthode de Lowry et coll. (1951).

Les résultats apparaissent dans le tableau 2.

Ils sont exprimés en ng d'hormone par ml et en mg de protéines par ml. Le rapport des taux de HPSM par rapport aux protéines totales permet de calculer la concentration relative (activité) de la HPSM dans ces liquides. Cette dernière est variable mais reste toujours faible et empêche d'utiliser ces liquides comme source de HPSM.

3) Dosage de la HPSM dans le sérum foetal.

Les foetus ont été recueillis à l'abattoir, le sang a été prélevé par ponction cardiaque 15 à 30 minutes après l'abattage de la mère. Les résultats apparaissent individuellement dans la figure 4.

TABLEAU 2. — Teneurs en H.P.S.M. et en protéines (Lowry) des liquides amniotiques et allantoïdiens.

Moment de la gestation en mois	<i>Liquides amniotiques</i>			<i>Liquides allantoïdiens</i>		
	H.P.S.M. en ng/ml	Protéines en mg/ml	Activité *	H.P.S.M. en ng/ml	Protéines en mg/ml	Activité *
2,5	1,5	0,23	0,0000065	17	1,44	0,000012
2,5	1,8	0,28	0,0000064	80	2,7	0,000032
3	9,6	0,31	0,0000310	38	2,4	0,000014
3	1	0,28	0,0000035	5,4	0,92	0,0000058
3	1,2	0,24	0,0000050	250	6,8	0,000037
3,5	9	0,2	0,0000450	20	3,3	0,0000060
3,5	8	0,4	0,000020	45	3,3	0,0000140
3,5 à 4	n.d.	0,2	n.d.	16,5	2,6	0,0000062
4,5	5,6	1,75	0,0000032	2,8	2,5	0,0000011
6	2,4	2	0,0000012	2,1	n.d.	n.d.
7	0,25	0,3	0,000008	6,58	3,75	0,0000017

n.d. : non déterminé.

* L'activité correspond au rapport H.P.S.M./protéines totales.

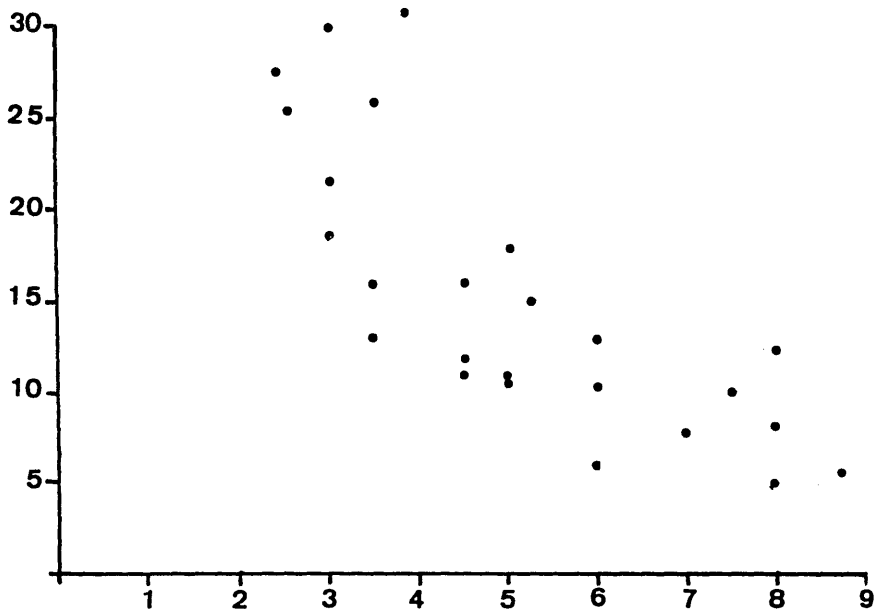


Fig. 4. — Teneur des sérums fœtaux en HPSM en fonction de l'âge.

Conditions : Dosage radioimmunologique réalisé suivant la méthode 2.

En abscisse : Age approximatif exprimé en mois.

En ordonnée : Concentration de HPSM exprimée en ng/ml.

Nous avons relevé les concentrations extrêmes de 5 à 30 ng/ml. La faible concentration de prolactine dans le sérum de foetus jeunes permet de comparer les taux de HPSM obtenus au moyen de la méthode radioimmunologique et ceux obtenus selon la méthode par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires mammaires. Pour réduire l'erreur due à l'interférence des protéines sériques le sérum foetal a été chromatographié sur Sephadex G-100 (Pharmacia) (Fig. 5).

4) Dosage de la HPSM dans le sérum maternel.

Dans les sérums de vaches en gestation, la concentration de la HPSM reste

toujours très faible, 100 μ l de sérum non dilué ne produisent jamais une inhibition complète de la liaison de la HPSM marquée aux anticorps. Par conséquent, nous avons mis au point une méthode permettant de pratiquer le dosage dans des volumes plus importants tout en conservant au mieux les qualités de sensibilité et de précision. Réalisés sur une centaine de vaches non gestantes, les dosages révèlent des teneurs indosables, en d'autres termes, inférieures à la sensibilité de la méthode.

La figure 6 permet de situer les taux de la HPSM sérique chez la vache gestante en fonction du moment de la gestation.

Ces valeurs sont toujours inférieures à 2 ng/ml. Mais il est très intéressant d'observer la présence de la HPSM dans le sérum de toutes nos vaches gestantes au-delà du 110^e jour de la gestation.

DISCUSSION

L'immunisation de lapins au moyen d'une préparation de HPSM hautement purifiée nous a fourni des antisérums très spécifiques permettant la mise au point d'un dosage radioimmunologique très sensible.

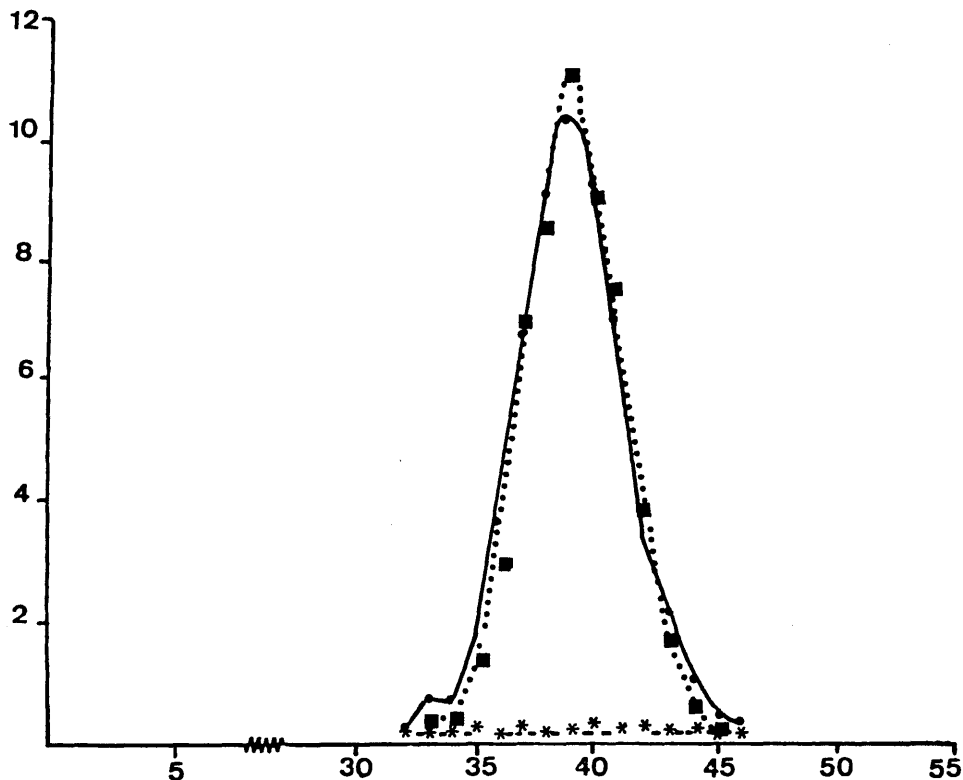


Fig. 5. — Comparaison des résultats obtenus par la méthode radioimmunologique et le dosage par liaison radiocompétitive aux récepteurs mammaires de lapine.

Conditions : 3 ml de sérum d'un fœtus âgé de 3 mois sont chromatographiés sur une colonne (1,5 × 100 cm) de Sephadex G-100 (Pharmacia) équilibrée en Tris-HCl 0,025 M ; MgCl₂ 0,010 M ; pH 7,6 ; 0,1 % bSA ; 0,01 % sulfate de Néomycine.

●—● dosage par liaison aux récepteurs

■...■ dosage radioimmunologique

- prolactine bovine, PRL-NIH-B4, dosage radioimmunologique spécifique

En abscisse : Numéro des fractions (2,2 ml)

En ordonnée : Quantité d'hormone, exprimée en ng, présente dans les différentes fractions.

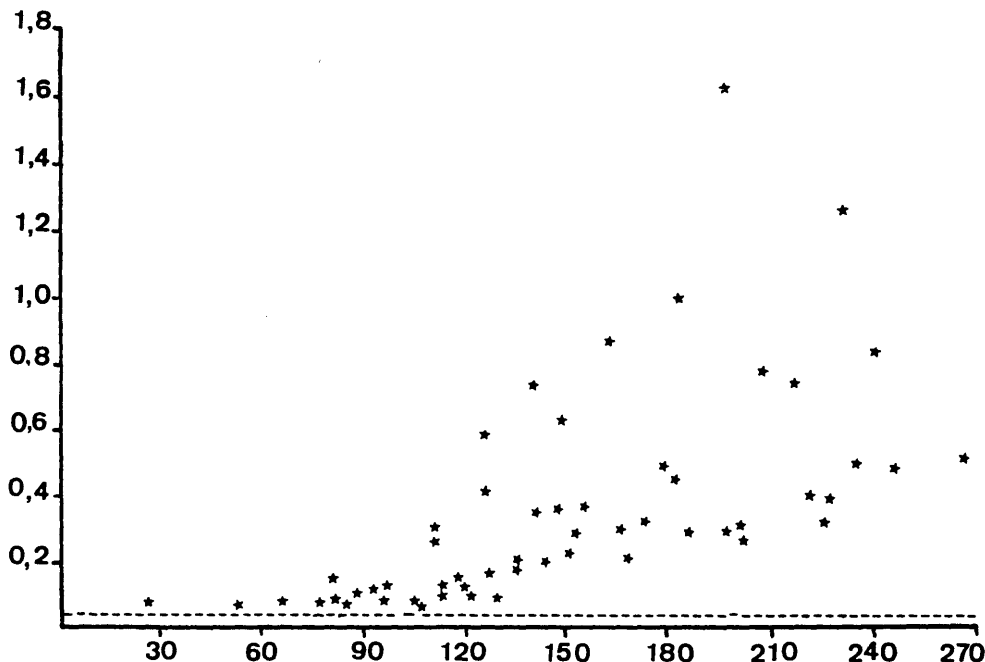


Fig. 6. — Teneurs des sérums maternels en HPSM en fonction du moment de la gestation.

Conditions : Dosage radioimmunologique réalisé suivant la méthode 3.

En abscisse : Moment de la gestation exprimé en jours.

En ordonnée : Concentration de la HPSM exprimée en ng/ml.

----- : Limite de la sensibilité de la méthode.

La teneur élevée de la HPSM dans les extraits de cotylédons autorise la mesure précise des concentrations au moyen de la méthode de dosage par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires de lapines.

Les résultats obtenus sont identiques quelle que soit la méthode utilisée, dosage radioimmunologique ou par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires hépatiques ou mammaires.

Dans les liquides amniotiques et allantoïdiens, le rapport de la concentration de HPSM et de protéines totales permet

de mettre en évidence l'activité hormonale très faible de ces liquides.

Dans les sérums de fœtus, les teneurs de la HPSM ont été déterminées avec précision et, moyennant certaines précautions, elles ont pu être comparées à celles déterminées en utilisant la méthode par liaison radiocompétitive aux récepteurs membranaires.

Dans les sérums de vaches gestantes, le dosage est beaucoup plus difficile à réaliser à cause de leur très faible concentration. Pour mesurer les taux de la HPSM dans le sérum maternel, nous

avons augmenté au maximum la sensibilité du dosage en utilisant des réactifs de haute qualité et en précisant au mieux les conditions d'incubation. Ainsi optimisé, le dosage radioimmunologique de la HPSM dans le sérum permet de repérer toutes les vaches gestantes au-delà du 110^e jour de la gestation.

Il est également intéressant de souligner l'observation chez les bovins de concentrations foetales toujours supérieures aux concentrations maternelles, alors que chez la brebis par exemple aux environs du 100^e jour de la gestation, il se produit une inversion de concentration (Chan et coll. ; 1978).

Si les teneurs très faibles de la HPSM dans le sérum des vaches gestantes ne s'expliquent pas actuellement, on peut toutefois penser à une élimination ou à

une dégradation très rapide de l'hormone.

CONCLUSIONS

L'immunisation de lapins au moyen d'une préparation de HPSM hautement purifiée a permis l'obtention d'antisérums spécifiques et la mise au point d'un dosage radioimmunologique sensible.

Là où la comparaison est possible, les résultats concordent avec ceux obtenus au moyen des dosages par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires.

Chez les bovins, la teneur du sérum maternel en HPSM est très faible et reste toujours inférieure à celle du sérum foetal.

BIBLIOGRAPHIE

- AXEN R., PORATH J. et ERNBACK S. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature*, 1967, 214, 1302.
- BECKERS J.F., FROMONT-LIENARD Ch., VAN DER ZWALMEN P., WOUTERS-BALLMAN P. et ECTORS F. Isolement d'une hormone placentaire bovine présentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance. *Ann. Méd. Vét.*, 1980, 124, 585.
- BECKERS J.F. et ECTORS F. Dosage de l'hormone placentaire somatotrope et mammatrope bovine par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, 125, 311.
- CHAN J.S.D., ROBERTSON H.A. et FRIESEN H.G. Maternal and Fetal Concentrations of Ovine Placental Lactogen Measured by Radioimmunoassay. *Endocrinology*, 1978, 102, 1606.
- GOCKE D.J., GERTEN J., SHERWOOD L. et LARAGH J.H. Physiological and pathological variations of plasma angiotensin II in man. *Circulation Research*, 1969, 24-25, suppl. 1, 131.
- HARBOE N., INGILD AG. Immunization, Isolation of Immunoglobulins, Estimation of Antibody Titre. *Scand. J. Immunology*, 1973, suppl. 1, 161.
- HUNTER W.M. The preparation and assessment of iodinated antigens. Dans : « Radioimmunoassay methods », (Kirkham K.E. et Hunter W.M. eds), 1971, p. 3-23, Churchill Livingstone, Edinburgh et London.
- KEKWICK R.A. The serum proteins in multiple myelomatosis. *Biochem. J.*, 1940, 34, 1248.
- KETELSLEGERS J.M., KNOTT G.D. et CATT K.J. Computer analysis of the binding reaction between hCG and Gonadotropin receptors of the rat testis. Dans : « Hormone binding and target cell activation in the testis ». (Dufau M.L. et Means A.R., eds). *Current Topics in Molecular Endocrinology*, 1974, Vol. 1, pp. 31-45. Plenum Press — New York et London.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.

- RODBARD D. (1971). Statistical aspects of radioimmunoassays. In: Principle of competitive protein-binding assays. Edited by Williams, D. Odell M.D. et Daughaday W.H. J.B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto, p. 204 (216).
- RODBARD D. (1974). Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.*, **20**, 1255 (1270).
- RODBARD D. et FRAZIER G.R. (1973). Radioimmunoassay data processing 2nd ed. Fortran IV-G Program listings (PB 217367) or magnetic tape (PB 217366), U.S. Dept. Commerce, National Technical Information Service, Springfield, Va., 1973.
- RODBARD D. et LEWALD J.E. (1970). Computer analysis of radioligand-assay and radioimmunoassay data. *Acta Endocrinol.* (Copenhagen), **64**, suppl. 147, 79 (92).
- ROULSTON J.E. Validation of the self-displacement technique for estimation of specific radioactivity of radioimmunoassay tracers. *Annals of Clin. Biochem.*, 1979, **16**, 26.
- THORELL J.I., et JOHANSSON B.G. Enzymatic iodination of polypeptides with I-125 to high specific activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **251**, 363.
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. et ROSS G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocr.*, 1971, **33**, 988.

SUMMARY

Radioimmunoassay of bovine Placental Somatomammotropin.

Highly specific antisera were obtained from rabbits immunized with a purified preparation of Bovine Placental Somatomammotropin leading to the development of a sensitive radioimmunoassay.

The values in cotyledons extracts and foetal serum given by this method are in agreement with those determined by radioreceptor assay using rabbit membranous receptors.

Placental somatomammotrophic hormone is always present in pregnant cow sera from day 110 after fertilization but at low concentration (≤ 2 ng/ml).