

DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ALPHA-MSH. ÉLABORATION D'UN ANTISÉRUM HAUTEMENT SPÉCIFIQUE : APPLICATION CHEZ LE RAT

J. VERSTEGEN¹, G. GHAENEN², C. DESSY¹ et J.F. BECKERS²

1 : Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, 45 rue des Vétérinaires, 1070 Bruxelles, Belgique.

2 : Laboratoire d'Obstétrique et des troubles de la Reproduction, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, 45, Rue des Vétérinaires, 1070 Bruxelles, Belgique.

3 : Laboratoire d'Oncologie et de Chirurgie expérimentale, Institut Bordet, Université libre de Bruxelles, Belgique.

Summary

RADIOIMMUNOLOGICAL DOSAGE OF PLASMATIC ALPHAMELANOTROPIN: ELABORATION OF A HIGHLY SPECIFIC ANTIBODY AND RAT APPLICATION. — A highly specific and sensitive RIA for alpha-MSH has been developed. Its main characteristic is the possibility to measure the alpha-MSH in the whole plasma without extraction. The double incubation technics has been utilized. It has been possible by the utilization of highly specific and affin antiserum.

L'alpha-MSH ou alphasélanotropine est un décapeptide hypophysaire dérivé de la proopiomélanocortine (POMC) découverte par Mains *et al.* (1977) et Roberts et Herbert (1977).

Cette molécule de taille importante est fragmentée par clivage enzymatique au niveau de paire d'acides aminés basiques, en peptides dont les plus importants sont les hormones adrénocorticotrope (39 AA) et bêtalipotrope (91 AA). Celles-ci peuvent être scindées en oligopeptides biologiquement actifs (fig. 1a) dont, d'une part, l'hormone alphasélanotropine (alpha-MSH), le « corticotropin like intermediate lobe peptide » (CLIP) et d'autre part les mélanotropine et endorphine bêta (bêta-MSH et bêta-END) (Chrétien *et al.*, 1977; Dessy *et al.*, 1973).

L'alpha-MSH est l'hormone mélanotropine la plus importante par sa quantité et son action mélanostimulante chez les amphibiens et les vertébrés inférieurs (Smith, 1916; Hogben *et al.*, 1922, 1924 et 1930; Shizume *et al.*, 1954; Burgers, 1961). Elle intervient également dans les compor-

tements d'adaptation à l'environnement chez le rat et l'homme (Kastin *et al.*, 1975; Van Wiemersma Greidanus, 1977), dans la croissance fœtale et la synthèse protidique chez le fœtus du rat (Swaab et Martin, 1981).

Sa présence dans de nombreux tissus a été démontrée chez de nombreuses espèces domestiques.

De nombreux bioessais ont été décrits pour doser les hormones mélanotropes. Ils étudiaient le développement et la dispersion des grains de mélanine dans les mélanocytes cutanés chez les vertébrés inférieurs. Les plus sensibles (environ 1 pg) étaient basés sur une méthode photoélectrique utilisant *in vitro* des fragments de peau de grenouilles ou d'amphibiens (Shizume *et al.*, 1954; Lerner et Wright, 1960; Kastin et Ross, 1964; Geschwind et Huseby, 1966; Howe et Thody, 1969; Bjorklund *et al.*, 1972).

Leur sensibilité était telle qu'elle permit le dosage des hormones mélanotropes plasmatiques et tissulaires. Cependant, ces bioessais ne permet-

taient pas de distinguer l'action respective des différentes hormones mélanotropes dérivées de la pro-opiomélanocortine (bêta-LPH, bêta-MSH, alpha-MSH et ACTH).

Les premiers radioimmunoessais qui ont permis de distinguer et de doser les différents dérivés ont été mis au point par Ross *et al.* (1966), Abe *et al.* (1967), Thody *et al.* (1975), Uzateguy *et al.* (1976), Vaudry *et al.* (1978).

Le présent travail décrit le développement d'un radioimmunoessai original hautement sensible et spécifique qui, à la différence des dosages décrits jusqu'à présent, mesure l'hormone plasmatique sans extraction préalable et qui devrait permettre d'approcher l'importance et le rôle de l'hormone alphamélanotrope dans les espèces domestiques. Dans cette étape préliminaire, le rat a été utilisé pour des raisons de facilité et de disponibilité des plasmas.

Matériel et Méthodes

a) Production des antisérums

1) Couplage de l'haptène à l'albumine bovine (BSA)

L'alpha-MSH synthétique (UCB) a été utilisée après couplage à la BSA (ou albumine bovine) par le 1-éthyl-3-(3-diméthyl-propyl)-carbodiimide (SIGMA) suivant la technique de Orth *et al.* (1979). La pureté des haptènes a été déterminée par chromatographie en couche mince dans le système *n*-butanol-pyridine-acide acétique-eau (4/1/1/2) et acétate d'éthyl-pyridine-acide acétique-eau (5/5/1/3). La révélation a été faite par les Chlorine et Tolidine (Ehrlich). La pureté a de plus été contrôlée par chromatographie en phase liquide (HPLC, colonne Merxck RP 18 - 250 x 4 mm - tampon phosphate de triéthylamine pH 3,5 + acétonitrile, gradient en acétonitrile de 15 à 30 % en 30 min. Débit de 1,5 ml/min). Dans le premier système, la pureté est supérieure à 99 % et de 99,7 % dans le deuxième système de contrôle. L'extrémité N terminale de l'alpha-MSH est concernée par cette liaison. L'efficacité de couplage de la technique a été testée par l'addition de 100 µg d'alpha-MSH iodée au mélange réactionnel, contenant 2,5 µmole d'alpha-

MSH (0,5 ml HCl 10⁻⁴N), 0,15 µmole de BSA (1 ml H₂O pH 7,2 ajusté par 0,1 N NaOH) et 100 mg de carbodiimide (0,3 ml H₂O).

La solution est passée sur une colonne de Sephadex G25 (Pharmacia-100 x 2,5 cm) équilibrée et éluée en acétate de soude pH ajusté à 4 par l'acide acétique. Des fractions de 5 ml sont récoltées sur lesquelles la quantité de traceur (localisation de l'alpha-MSH marquée libre et liée) et la transmission UV à 280 nm (localisation de la BSA) sont mesurées afin de déterminer le pourcentage de couplage suivant Orth (1979). Le volume final de peptides couplés est ajusté à 20 ml et réparti en fractions de 1 ml contenant 100 µg d'haptènes couplés. Les solutions sont conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

2) Immunisation

Quatre jeunes lapins mâles de 2 à 3 kg, 2 blancs de Termonde de race pure (lapins 97 et 99), et 2 croisés blanc de Termonde-Californien de 1^{re} génération (lapins 98 et 100) ont été immunisés.

Cent microgrammes d'haptènes couplés en solution sont émulsionnés dans de l'adjuvant complet de Freund (DIFCO 1 ml/1 ml) et injectés en 20 à 30 points dans le derme dorsal. Le mélange immunisant est préparé suivant Vaitukaitis *et al.* (1971). Les injections sont répétées tous les 15 à 20 jours, pendant 2 mois et demi, ensuite tous les mois pendant 6 à 7 mois. Des saignées mensuelles, à la veine auriculaire interne, de 70 à 100 ml sont réalisées à partir du troisième mois de l'immunisation.

b) Radioiodination de l'alpha-MSH

L'alpha-MSH synthétique a été marquée à l'iode 125 suivant la technique de Greenwood *et al.* (1963). Une solution de 2 µg d'alpha-MSH dans 2 µl de tampon HCl N/200 est additionnée d'un millicurie d'iode 125, de 20 µl de tampon phosphate (0,5 M pH: 7,4) et de 10 µl de chloramine T (2,5 mg/ml tampon phosphate 5 x 10⁻³M).

La réaction se réalise en 30 secondes sous agitation constante et est ensuite arrêtée par addition de 20 µl de métabisulfite de soude (2,5 mg/ml tampon phosphate pH 7,2; 5 x 10⁻³M). Le mélange est passé sur une colonne de Sephadex G10 (20 cm x 1 cm) gonflée en HCl N/200 et saturée en BSA (20 ml HCl N/200 + 0,1 % BSA). L'éluion est réalisée dans le tampon de préparation. Des fractions d'1 ml sont récoltées. Le sommet du

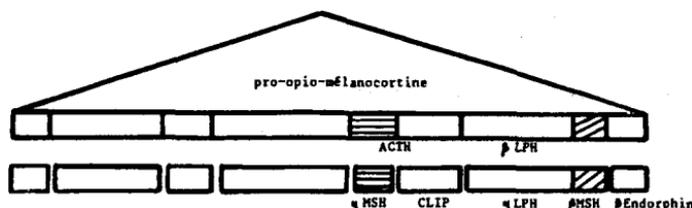


Fig. 1a. — Chaîne de clivage enzymatique de la proopiomélanocortine au niveau de paire d'acides aminés basiques.

pic d'émission est conservé, fractionné et stocké à -20°C .

La conservation de l'hormone liée pendant 5 à 6 semaines entraîne une perte de sensibilité faible du radioimmunoessai (perte de 10% de la fixation du Bo). L'activité spécifique de l'alpha-MSH a été calculée suivant Landon *et al.* (1967).

c) Études des antisérums

Tous les tests décrits par la suite sont réalisés en triple, chaque série est complétée par des tubes ne contenant pas de standard froid (Bo) et d'autres ne contenant pas d'antisérum (Ns); le tampon utilisé est un tampon phosphate pH 7,6; BSA 2,5%; gélatine 0,1%. Le volume final d'incubation est de 500 μl .

1. Titre

Après chaque saignée, des courbes de dilution de l'antisérum sont réalisées afin d'en déterminer le titre de fixation. L'antisérum à tester est dilué de 1/1000 à 1/160 000 en dilution finale et incubé 16 h en présence de 5 000 cpm de traceur. La séparation du complexe antigène-anticorps de l'antigène libre est réalisée par la technique au Charbon Dextran (Herberts *et al.*, 1965) modifiée:

1 ml de solution de Charbon (Dextran T 70 0,25 g; Charbon Norit A 1 g dans 1 litre de tampon à 4°C) est additionné au milieu d'incubation, laissé 20 minutes au bain marie dans la glace et centrifugé 10 minutes à 2 400 g. Le surnageant est récolté et la radioactivité contenue dans le culot et le surnageant est comptée (compteur minigamma LKB 85% de rendement de comptage).

2. Courbe standard et spécificité

La courbe de compétition est obtenue en additionnant 0,9; 1,8; 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 pg (dans 100 μl de tampon) d'alpha-MSH froide au tube contenant l'antisérum. Après une préincubation de 16 h à 4°C , le traceur est additionné à raison de 100 μl (5 000 cpm) et le mélange incubé 6 h à 4°C . La séparation est réalisée comme décrit ci-dessus.

Afin de tester le parallélisme lors de dilution en tampon et en plasma des courbes standard ont été réalisées en remplaçant le tampon soit par du plasma de rats normaux épuisé contre les différents haptènes par chromatographie d'affinité sur protéine-A ultrogel (LKB) soit par du plasma de rats hypophysectomisés.

La spécificité est étudiée en remplaçant l'alpha-MSH par des dilutions d'ordre 2 des haptènes suivants: ACTH 1-24, ACTH 17-39, ACTH 4-10, ACTH 5-10, gamma-MSH, bêta-MSH, bêta-endorphine et bêta-LPH. Nous avons testé la spécificité de nos anticorps vis-à-vis de ces haptènes car ils présentent des homologies de structures avec l'alpha-MSH utilisée comme antigène. La séquence 4-10 de l'alpha-MSH est commune à tous ces peptides de même que l'alpha-MSH correspond aux 13 premiers acides aminés de l'ACTH (fig. 1b). Nous avons ajouté des quantités variant de 1 pg à 10 μg /tube.

d) Dosage de l'alpha-MSH plasmatique

Le sang de rats Wistar mâles et femelles de 225 à 250 g est obtenu après décapitation, récolté dans des tubes contenant de l'EDTA et immédiatement centrifugés.

Les plasmas obtenus sont répartis par fractions de

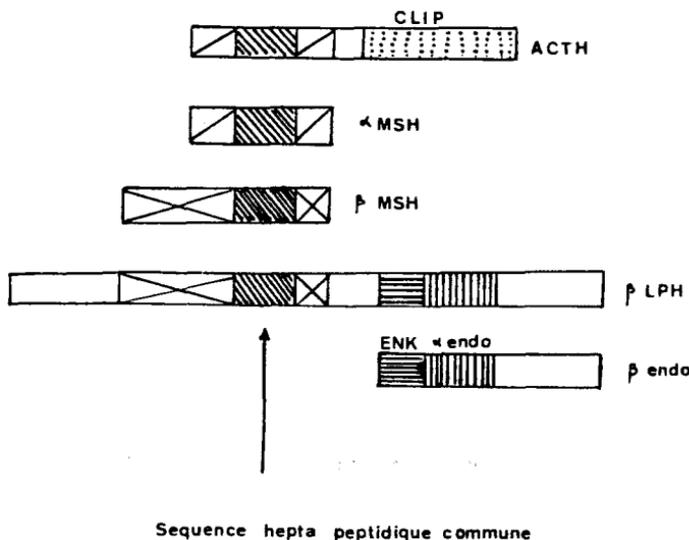


Fig. 1b. — Structure comparée de la betalipotropine, de la mélanotropine alpha et bêta et de l'hormone adrénocorticotrope. Les séquences identiques sont représentées par le même type de dessin.

1 ml et lorsque le dosage n'est pas immédiatement effectué conservés à -20°C .

Nous avons dosé l' α -MSH dans le plasma de rats normaux ($n = 16$) et de rats stressés à l'éther pendant des temps de 5 ($n = 8$), 15 ($n = 8$), et 30 minutes ($n = 8$). Les dosages ont été effectués sans extraction plasmatique de l'hormone à 3 dilutions: 50 μl , 100 μl et 200 μl /tube à essai.

Résultats

1. Production des antisérums

L'efficacité de la technique de couplage de l' α -MSH à la BSA, déterminée par spectrophotométrie et par mesure de la radioactivité avant et après couplage, fut de 40 %. Environ 7

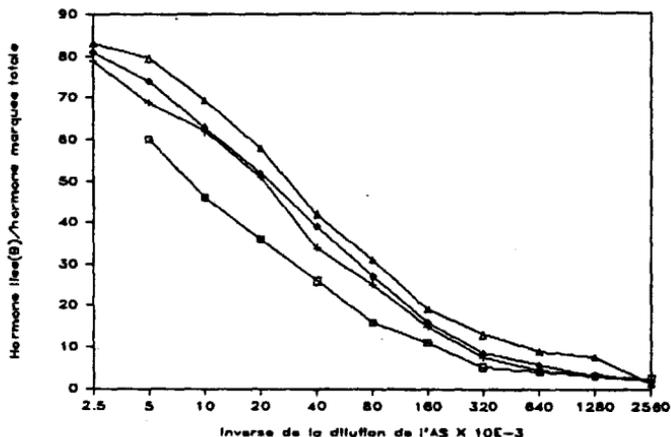


Fig. 2. — Évolution du titre de l'antisérum produit par le lapin 98 en fonction de la durée d'immunisation.
□: après 2 mois, +: 3 mois, ◇: 4 mois, Δ: 5 mois d'immunisation.

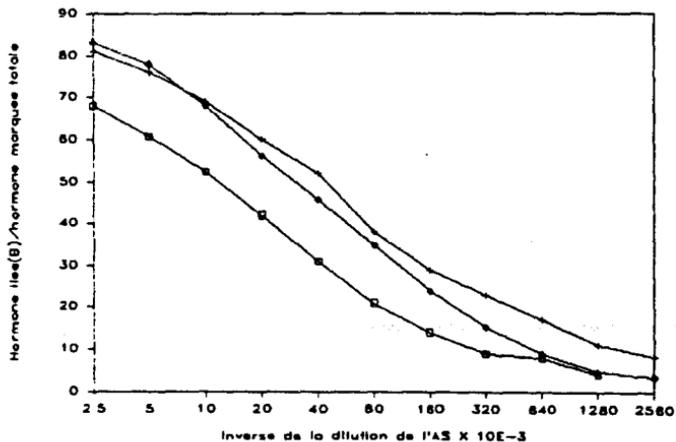


Fig. 3. — Évolution du titre de l'antisérum produit par le lapin 100 en fonction de la durée d'immunisation.
□: après 2 mois, +: 3 mois ◇: 4 mois d'immunisation.

molécules d'alpha-MSH ont été ainsi liées à 1 molécule de BSA (soit 1,1 μ mole alpha-MSH pour 0,15 μ mole BSA).

Les anticorps sont mis en évidence après 2 mois d'immunisation mais le titre des antisérums est encore faible à ce moment. Chez les animaux de race pure le titre reste faible, les immunosérums peu spécifiques et de faible affinité pour l'alpha-MSH.

Chez les deux lapins de race croisée, les immu-

nisations successives induisent une croissance du titre sérologique qui passe par un sommet au quatrième mois lors de la cinquième saignée pour le lapin 100 et lors du cinquième mois (sixième saignée) pour le lapin 98 (fig. 2 et 3).

La dilution usuelle des antisérums de ces deux lapins (saignée 5 pour le 100 et 6 pour le 98) est de 1/40 000 et correspond à une fixation de 30 % du traceur en plasma dans les conditions décrites après.

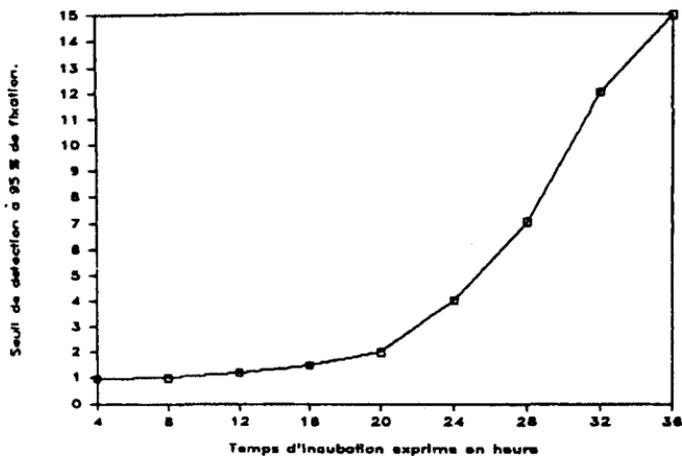


Fig. 4 Evolution du seuil maximum de détection en fonction de la durée d'incubation. Antisérum 100 (5^e saignée) dilution de 1/40 000.

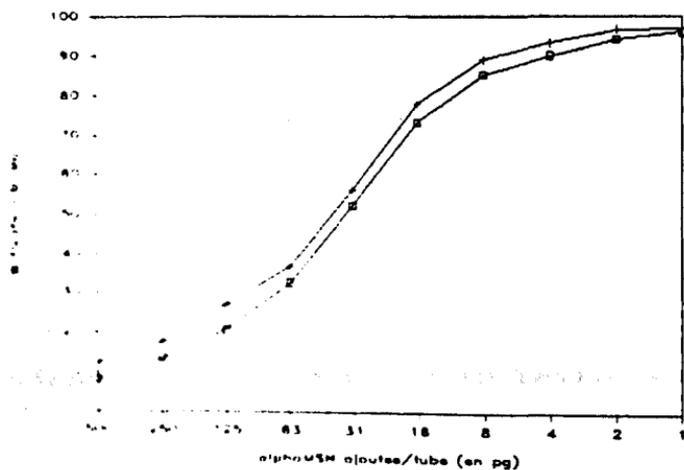


Fig. 5 Fixation en pourcentage par alpha-MSH froide. Les points blancs sont en tampon (-) et en plasma (+) pour 100 μ l de plasma. La dilution usuelle est de 500 μ l.

Tableau 1. — Spécificité des antisera 3 et 4.

Pourcentage de fixation des différents peptides aux antisera 100 (5^e saignée) et 98 (6^e saignée). La fixation de l'alpha-MSH est considérée comme égale à 100 %.

Peptide	AS 100 (5)	1/40 000
	Réactions croisées/alpha-MSH	
bêta-MSH		<0,001
ACTH 1-24		<0,001
ACTH 4-10		<0,001
ACTH 5-10		<0,001
bêta-LPH		0,008 to 0,01

Peptide	AS 98 (6)	1/40 000
	Réactions croisées/alpha-MSH	
bêta-MSH		<0,001
ACTH 4-10		<0,001
ACTH 5-10		<0,001
ACTH 1-24		<0,001
bêta-LPH		0,2

2. Les courbes standard

Le taux moyen de radioiodination calculé sur 10 marquages successifs était de 89 % et l'activité spécifique moyenne de 1 800 mCi/ μ mole.

Le seuil de détection de cette technique est de 1 pg d'alpha-MSH/tube à 95 % de fixation B/Bo. La figure 4 montre l'effet de la durée d'incubation sur la valeur de ce seuil de détection. Le coefficient de variabilité intraessai ($n = 20$) est extrêmement faible variant de 0,35 à 5,05 avec une moyenne de 1,74 ; le coefficient de variation inter-essai réalisé sur 10 échantillons de plasma identique et dosé 5 fois varie de 6,87 à 17,2 % avec une moyenne de 8,17 % ; la fixation non spécifique du traceur est en moyenne de 6,3 % avec une variabilité de 2 à 10,1 %.

Les courbes standard de dilution en tampon et en plasma présentent un parallélisme total de déplacement (fig. 5). Le pourcentage de récupération dans ce cas est de 85 % par rapport à la récupération en tampon avec une variation de 79 à 92 %.

3. Spécificité et dosage plasmatique

Les différents peptides examinés ne présentent pour certains aucune réaction, pour d'autres, une réaction croisée de très faible à négligeable vis-à-vis des anti-alpha-MSH (tabl. 1) produit par les deux lapins de race croisée. L'antisérum produit par le lapin 98 présente une réaction croisée vis-à-vis de la bêta-LPH légèrement supérieure (0,2 % contre 0,008 %) à celle observée pour l'antisérum produit par l'autre lapin. Cette légère différence

bien que non significative et tout autre critère étant égal (titre, affinité pour l'alpha-MSH) nous a fait utiliser l'antisérum produit par le lapin 100 pour les études décrites.

Le dosage de l'alpha-MSH plasmatique du rat normal nous a donné une moyenne de 50 pg/ml ($n = 16$) avec une déviation standard de 11. La teneur en alpha-MSH des plasmas épuisés ou provenant des rats hypophysectomisés est toujours inférieure au seuil de détection de la technique.

Lors du stress à l'éther on peut observer après cinq minutes un pic plasmatique montant à 176 pg avec une déviation standard de 8 ($n = 8$). Ce pic est extrêmement transitoire et passager.

Chez les rats anesthésiés après 15 minutes, le taux est revenu à la normale (53 pg \pm 6 ($n = 8$)). Il en est de même après 30 minutes où la valeur moyenne est de 51 pg \pm 9 ($n = 8$).

Discussion

Il est important de noter les variations individuelles dans la réponse immunologique entre les différents animaux que ce soit quant au titre ou à l'évolution dans le temps des réponses aux immunisations.

Chez les lapins de races croisées, les anticorps produits se caractérisent par la spécificité et l'affinité. Chez les deux lapins de races pures, la réponse est par contre faible en qualité et quantité. L'excellente réponse des deux animaux hybrides par rapport aux deux autres, semble

confirmer l'avantage des animaux de races croisées sur les animaux de races pures comme Szelce (1983) l'a déjà souligné de même qu'il soulignait l'utilité d'immuniser simultanément plusieurs animaux pour pallier l'extrême variabilité dans les réponses immunitaires.

L'injection de faibles doses répétées d'immuno-gènes diminuent le risque de production d'anticorps non spécifiques (Edelman, 1973). Le tableau des spécificités montre une réaction croisée faible vis-à-vis de la bêta-LPH. Cependant n'étant pas un produit de synthèse, le peptide utilisé contenait probablement de l'alpha-MSH en quantité faible. Cette pureté relative est vraisemblablement responsable des réactions croisées de nos antisérums vis-à-vis de cet antigène. L'absence de réaction vis-à-vis de l'ACTH 4-10, de l'ACTH 5-10 qui sont les fragments polypeptidiques communs aux différentes hormones étudiées et vis-à-vis de l'ACTH 1-24 situe le site antigénique de l'alpha-MSH au niveau des quatre derniers acides aminés (glycine, lysine, proline, valine et un groupement NH_2 ; Kopp *et al.*, 1977).

La sensibilité du radioimmunoessai (en moyenne de 10 pg/ml de plasma à 95 % de fixations) a été accrue par la préincubation, l'incubation très courte, l'abaissement de la quantité de traceur et la dilution élevée de l'antisérum. Les coefficients de variation intraessai (1,74) et interessai (8,1) sont comparables à ceux obtenus par Wilson en 1979 avec respectivement 3,1 et 7,2 % et nettement inférieurs à ceux obtenus par Orth en 1979 (7 et 11 %) ou par Thody *et al.* en 1975 (14 et 13 %).

La technique utilisée a permis d'obtenir des résultats qui, quant à la dynamique d'évolution de

l'alpha-MSH plasmatique après un stress à l'éther, correspondent à ceux décrits par Kastin *et al.* (1964, 1969 et 1975), Uzateguy (1976) et Penny et Thody (1976). Ils diffèrent cependant assez nettement quant aux valeurs absolues des résultats obtenus par Penny et Thody (1976) dont les valeurs sont plus élevées, mais correspondent aux résultats d'Uzateguy (1976) qui obtient 64 pg/ml de plasma et de Wilson (1979) qui en trouve 58 ± 17 . Les tests à l'éther n'ont été réalisés qu'en tant que test du RIA. La technique utilisée nous a permis de doser de façon répétable et sans extraction l'alpha-MSH plasmatique.

L'adaptation de ce RIA à d'autres espèces animales (porcine, bovine, canine et féline entre autres) devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle de l'alpha-MSH chez les mammifères supérieurs.

Reçu le 28 novembre 1984.

Accepté le 18 janvier 1985.

Remerciements

Nous remercions les docteurs K. Scheibli et Schroter (CIBA-GEIGY) pour le don généreux des différents peptides de synthèse utilisés.

Nous remercions également Madame Billen Vertommen pour son assistance technique.

Travail subventionné par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA).

Résumé

Un radioimmunoessai de l'alpha-MSH plasmatique hautement spécifique et sensible de l'alpha-MSH a été développé. Sa caractéristique principale est la possibilité de mesurer l'alpha-MSH dans le plasma total sans extraction. La technique de la double incubation a été utilisée.

Références

- ABE K., ISLAND D., LIDDLE G., FLESCHER N., NICHOLSON N., 1967. Radioimmunologic evidence for alpha-MSH in human pituitary and tumor tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **27**, 46-52.
- BJORKLUND A., MURLING P., NILSON G., NOBIN A., 1972. Standardisation and evaluation of a sensitive and convenient assay for MSH using anolis skin *in vitro*. *J. Endocrinol.*, **53**, 161-169.
- BURGERS A.C.J., 1961. Occurrence of three electrophoretic components with melanocyte stimulating activity in extracts of single pituitary glands from ungulates. *Endocrinology*, **68**, 698.
- CHARD T., 1981. *An introduction to RIA and related techniques*. North Holland publ. com. 2^e ed.
- CHRETIEN M., SEIDAH M.G., BENJANNET S., DRAGON T., ROUTHIER R., MOTOMATSU T., CRINE P., LIS M., 1977. A beta-LPH precursor model: recent developments concerning morphin-like substances. *Ann. NY Acad. Sci.*, **84**, 297.
- DESSY C., HERLANT M., CHRETIEN M., 1973. Détection par immunofluorescence des cellules synthétisant la lipotropine. *CR. Acad. Sci., Paris*, **276**, 335-338.
- EDELMAN J., 1973. Antibody structure and molecules immunology. *Science*, **180**, 830-840.

- GESCHWIND I., HUSEBY R.A., 1966. Melanocyte-stimulating activity in a transplantable mouse pituitary tumor. *Endocrinology*, **79**, 97-105.
- GREENWOOD F.C., HUNTER W.M., GLOVER J.S., 1963. The preparation of I¹³¹ labelled HGH of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, **89**, 114-123.
- HERBERTS V., LAU K.S., GOTLIEB C.W., BLUCHER S.J., 1965. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **25**, 1375.
- HOGBEN L.T., WINTON F.R., 1922. The pigmentary effector system: reaction of frog's Melanophores to pituitary extracts. *Roy. Soc. B.*, **93**, 318-329.
- HOGBEN L.T., WINTON F.R., 1924. The pigmentary effector system. 3. Colour response in the hypophysectomised frog. *Proc. Roy. Soc.*, **95**, 15-31.
- HOGBEN L.T., GORDON C., 1930. Studies on the pituitary VII. The separate identity of the pressor and melanophore principles. *J. Exp. Biol.*, **7**, 286-292.
- HOWE A., THODY A.J., 1969. The effect of hypothalamic lesions on the MSH content and histology of the pars intermedia of the rat pituitary gland. *J. Physiol.*, **203**, 159-171.
- KASTIN A.J., ROSS G.T., 1964. Modified *in vivo* assay for MSH. *Experientia*, **20**, 461-462.
- KASTIN A.J., SCHALLY A.V., VIOSCA S., MILLER M.C., 1969. MSH activity in plasma and pituitaries of rat after various treatments. *Endocrinology*, **84**, 20.
- KASTIN A.J., SANDMAN C.A., STRATTON L.O., SCHALLY A.V., MILLER L.A., 1975. Behavioral and electrographic changes in rat and man after MSH. *Prog. Brain Res.*, **143**, 15a.
- KOPP A.G., EBERLE A., VITINS P., LICHTENBEYGER W., SCHWYZER R., 1977. Specific antibodies against alpha-MSH for RIA. *Eur. J. Biochem.*, **75**, 417-422.
- LANDON J., LIVANOV T., GREENWOOD F.C., 1967. The preparation and immunological properties of I¹³¹ labelled ACTH. *Biochem. J.*, **105**, 1075-1083.
- LENER A.B., WRIGHT M.R., 1960. *In vitro* frog skin assay for agents that darker and lighter melanocytes. *Meth. Biochem. Analys.*, **8**, 295-307.
- MAINS R., EIPPER B., LING N., 1977. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3014-3016.
- ORTH D.N., TANAKA K., NICHOLSON W.E., 1979. Melanocyte stimulating hormone and lipotropic hormones. In: Jaffe BN, Behrman HR. (eds) *Methods of hormone RIA*, 2nd ed., Chap. 13, Academic Press, New York.
- PENNY P.J., THODY A.J., 1976. Preliminary studies on the control of alpha-MSH secretion in the rat. *Endocrinology*, **69**, 56.
- ROBERTS J.L., HERBERT E., 1977. Characterization of a common precursor to corticotropin and beta lipotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5300-5304.
- ROOS G.T., ODELL W.D., GOODFRIEND T., 1966. Radioimmunoassay for alpha-MSH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 218-220.
- SHIZUME K., LENER A.B., FITZPATRICK T.P., 1954. *In vitro* bioassay for the MSH. *Endocrinology*, **54**, 553-560.
- SMITH P.E., 1976. Experimental ablation of the hypophysis in the frog. *Science*, **44**, 280.
- SWAAB D.F., MARTIN J.T., 1981. Functions of alphanelanotropin and other opiomelanocortin peptides in labour, intrauterine growth and brain development. In: *Peptides of the pars intermedia*, 196-200, Ciba Foundation symposium, London.
- SZELKE M., 1983. Raising antibodies to small peptides. In: Polak J.M., Van Noorden S., Wright P.S.G. (eds) *Immunocytochemistry, applications in pathology and biology*, 53, Bristol.
- THODY R.J., PENNEY J., DECLARK TAYLOR C.H., 1975. Development of a radioimmunoassay for alpha-MSH in the rat. *J. Endocrinol.*, **67**, 385-395.
- UZATEGUY R., OLIVIER Ch., VAUDRY M., LOMPARDI G., ROZENBERG I., MOURRE A.M., 1976. Immunoreactive alpha-MSH and ACTH levels in rat plasma and pituitary. *Endocrinology*, **98**, 189-196.
- VAITUKAITIS K., 1971. A method for proceeding specific antiserum with small dose of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **33**, 988-991.
- VAN WIEMERSMA GREIDANIUS, 1977. Effect of MSH and related peptides in avoidance behavior in rats. *Front. Horm. Res.*, **4**, 129-139.
- VAUDRY H., OLIVER C., JEGOU S., LÉBOULANGER F., TONOM M., DELARUE C., MORIN J., VAILLANT R., 1978. Immunoreactive alpha-MSH in the brain of the frog (*Rana Esculentata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **34**, 391.
- WILSON J.F., MORGAN M.A., 1979. A radioimmunoassay for alpha-MSH in rat plasma. *J. Pharm. Meth.*, **47**, 96.