

C. R. Soc. Biol., 1981, 175, 389-396.

### Neuroendocrinologie.

#### Libération intermittente de gonadolibérine (GnRH) par l'hypothalamus du Rat *in vitro*,

par J. P. BOURGUIGNON et P. FRANCHIMONT (\*).

*Clinique Pédiatrique (J 5) Université de Liège, Hôpital de Bavière,  
B-4020 Liège, Belgique et Laboratoire de Radioimmunologie,  
Université de Liège, Tour de Pathologie (B 23),  
Sart Tilman par Liège 1, Belgique.*

(reçue le 6 mars 1981).

*Summary.* — Hypothalamus were dissected from suprachiasmatic area to mamillary bodies in 50 days old male rats. These fragments were subsequently removed and incubated for 3 hours at 37°C in Dulbecco Modified Eagle's medium supplemented with glucose and containing calcium (1.25 mM) and potassium (5.81 mM). Incubation medium was changed every 5 or 15 minutes and immediately collected at 4°C for highly specific radioimmunoassay of GnRH using R 42 antiserum of Nett and Niswender. In these conditions, mean  $\pm$  1 SD release of immunoreactive GnRH per 1 hour was  $199 \pm 68$  pg ( $n = 4$ ) and  $135 \pm 38$  pg ( $n = 6$ ) in medium collected every 5 and 15 minutes respectively. Furthermore GnRH release was found to be episodic, 3 to 5 peaks being observed during a period of 2 hours. It is concluded that, following deafferentation and isolation *in vitro*, mature hypothalamus remains capable of releasing GnRH in a spontaneous periodic manner, suggesting that this particular feature of neuroendocrine maturation can be initiated in the hypothalamus itself.

*Résumé.* — Des hypothalamus entiers ont été rapidement disséqués depuis la région suprachiasmique jusqu'aux corps mamilaires, chez des rats mâles âgés de 50 jours. Les fragments prélevés ont été incubés pendant 3 heures à 37°C dans un milieu (Dulbecco modified Eagle's medium) enrichi en glucose et contenant du calcium (1,25 mM) et du potassium (5,81 mM). Le milieu d'incubation a été renouvelé toutes les 5 à 15 minutes et immédiatement réparti à 4°C pour le dosage radio-immunologique hautement spécifique de GnRH à l'aide de l'antisérum R 42 de Nett et Niswender. Dans ces conditions, la libération horaire moyenne de GnRH  $\pm$  1 DS est de  $199 \pm 68$  pg ( $n = 4$ ) et  $135 \pm 38$  pg ( $n = 6$ ) selon que le milieu est renouvelé toutes les 5 et 15 minutes respectivement. De plus, cette libération est intermittente et 3 à 5 pics sont observés en l'espace de deux heures. Cette expérience suggère que l'hypothalamus mature déafférentié et isolé *in vitro* est spontanément capable d'une libération périodique de GnRH, et possède ainsi *per se* cette caractéristique fonctionnelle de maturation neuro-endocrinienne.

(\*) Avec l'assistance technique de A. Gérard.

Chez diverses espèces animales comme chez l'Homme, il a été démontré que la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, et particulièrement celle de l'hormone lutéinisante (LH), s'effectue suivant un mode pulsatile à partir de la puberté (1). Ainsi, chez le Rat mature, normal ou castré, la LH plasmatique présente un pic survenant environ toutes les 30 minutes (2). De plus, on a observé que la sécrétion de GnRH mesurée au niveau de la circulation porte-hypophysaire chez le Singe (3), et au sein de l'hypothalamus médio-basal chez le Rat (4), s'effectuait selon un mode pulsatile.

Enfin, de récentes expérimentations ont souligné l'importance fonctionnelle du caractère pulsatile de la sécrétion de GnRH, notamment chez le Singe et le Rat (5 à 8). Chez ce dernier, Nansel et Trent (8) ont montré qu'une administration continue ou pulsatile horaire de GnRH ne permettait pas d'observer l'action inhibitrice de la dihydrotestostérone (DHT) sur l'hypophyse du rat mâle castré, alors que l'injection de GnRH avec une périodicité physiologique semi-horaire permettait le rétro-contrôle négatif des gonadotrophines par la DHT chez le même animal. Etant donné l'importance du caractère pulsatile de la libération de GnRH hypothalamique dans le déterminisme de la réponse hypophysaire gonadotrope, divers auteurs se sont attaché à étudier son mécanisme par des expériences de déafférentiation hypothalamique à divers niveaux *in vivo*. Notamment, Soper et Weick (9) ont montré que la déafférentiation hypothalamique complète, chez des rattes ovariectomisées, n'affectait pas le caractère pulsatile de la libération de LH, sauf si la section lésait le noyau arqué. Nous avons entrepris d'étudier la libération du GnRH par l'hypothalamus du Rat, *in vitro*, dans le but de déterminer si, dans ces conditions, cette sécrétion gardait un caractère pulsatile ou périodique.

**Matériel et Méthodes.** — 1. ISOLEMENT ET CULTURE D'HYPOTHALAMUS. — Après décapitation de rats mâles pubères âgés de 50 à 60 jours, l'hypothalamus est prélevé rapidement en effectuant une section sagittale au niveau des sillons latéraux, une section transversale au niveau du chiasma et du bord postérieur des corps mamillaires et, enfin, une section frontale à une profondeur de 2 mm environ. L'hypothalamus ainsi isolé de la région suprachiasmatique jusqu'aux corps mamillaires a un poids voisin de 25 mg. Les hypothalamus sont immédiatement plongés dans le milieu de culture, à savoir le DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium) contenant notamment du calcium (1,25 mM), du potassium (5,81 mM) et enrichi en glucose. Par la suite, les hypothalamus sont incubés dans ce milieu à 37°C dans une atmosphère air/CO<sub>2</sub> (95 % / 5 % V/V) saturée d'humidité. Après une période de 15 minutes permettant d'équilibrer l'hypothalamus aux conditions ambiantes, le milieu d'incubation est renouvelé et la libération de GnRH est alors étudiée pendant 3 heures.

Dans une première expérience, chaque hypothalamus est mis à incuber dans un tube de polypropylène contenant 0,5 ml de milieu. Les tubes sont maintenus pendant 12 minutes dans l'incubateur. Ils en sont alors retirés pendant 3 minutes afin de prélever le milieu d'incubation et de le remplacer par du milieu neuf porté auparavant à 37°C. Lors d'une seconde expérience, 4 hypothalamus mis à incuber chacun dans

une chambre de périfusion constituée d'une seringue en polypropylène dans laquelle l'hypothalamus est retenu par un treillis en acier inoxydable. Cette chambre permet de soustraire et d'ajouter du milieu de perfusion sans retirer l'hypothalamus de l'incubateur (fig. 1). Dans ces conditions, le milieu (0,5 ml) est renouvelé toutes les 5 minutes et recueilli dans des tubes refroidis dans la glace. Deux aliquots de 0,2 ml sont immédiatement répartis pour le dosage radio-immunologique de GnRH et congelés.

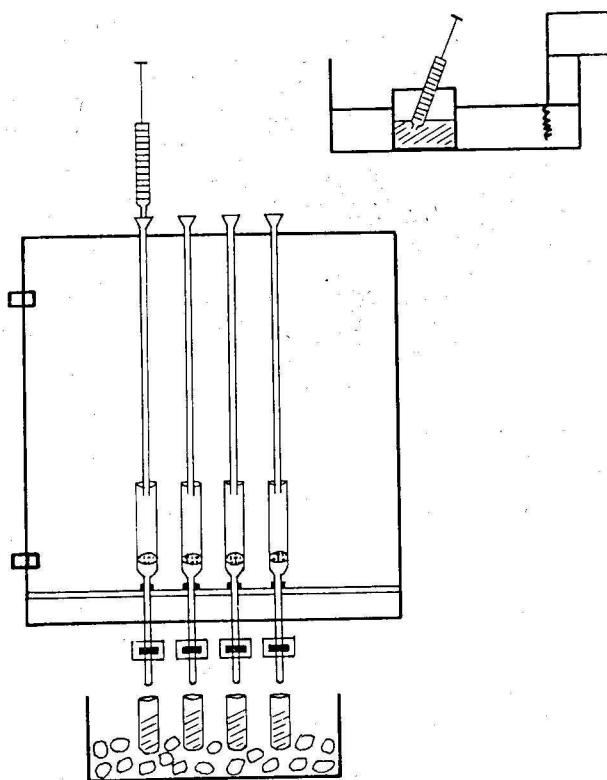


FIG. 1.

Illustration schématique des chambres de périfusion : le milieu de culture, porté à 37°C, est injecté dans un cathéter pénétrant dans l'incubateur jusqu'à la chambre de périfusion dans laquelle l'hypothalamus repose sur un treillis d'acier inoxydable. Par la suite, le milieu est soustrait par déclampage du cathéter quittant l'incubateur, et recueilli dans des tubes refroidis à 4°C.

2. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE GnRH. — Le dosage radioimmunologique de GnRH est réalisé selon une méthode décrite précédemment (10 à 12) à l'aide de l'antisérum R 42 aimablement fourni par les Docteurs Neff et Niswender (13). Cet antisérum, hautement spécifique du décapeptide, est utilisé à une dilution finale de 1/100 000. La sépa-

ration de la radioactivité liée à l'antisérum est obtenue par addition d'immunosorbant (anticorps anti-IgG de Lapin couplés par méthode chimique à un support de cellulose) (14), agitation à température am-

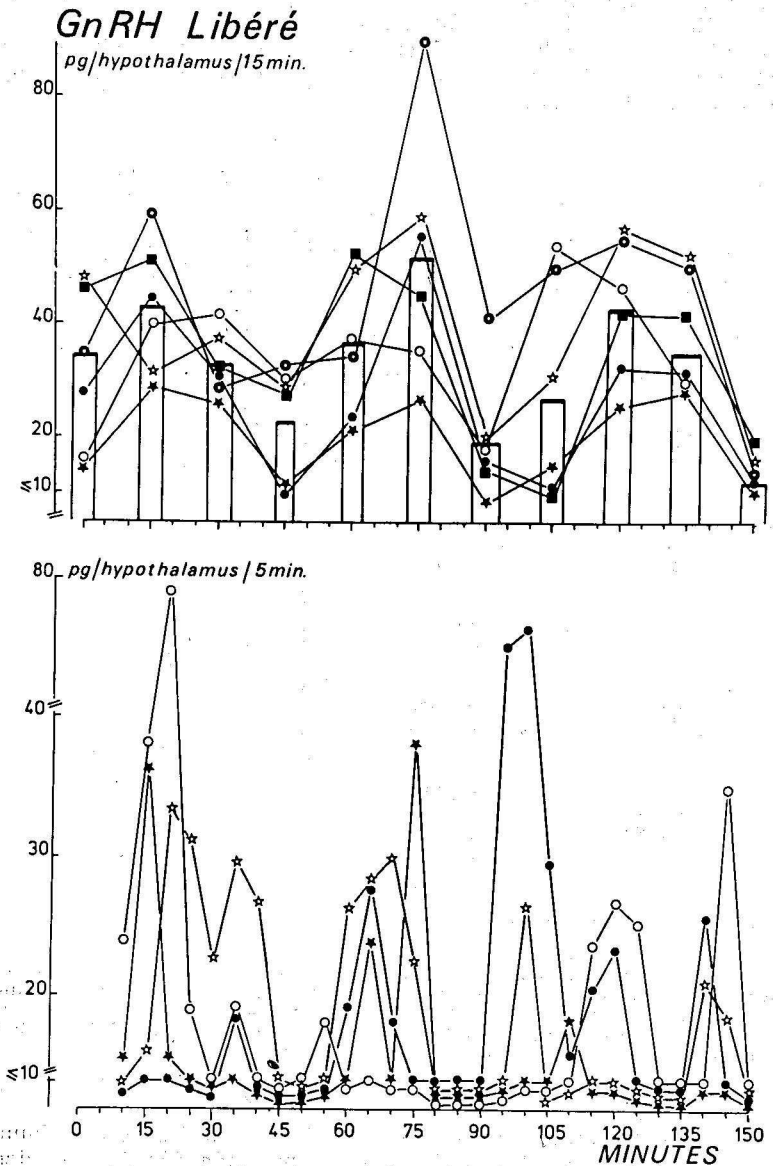


FIG. 2.

Libération de GnRH par l'hypothalamus dans le milieu de culture recueilli toutes les 15 minutes (partie supérieure) ou 5 minutes (partie inférieure) au cours d'une période de 150 minutes.

biente pendant 90 minutes et centrifugation. Les diverses concentrations de décapeptide synthétique (LH-RH, Hoechst A.G.) de la courbe de référence sont préparées dans le milieu de culture tandis que le traceur et l'antisérum sont dilués dans le tampon du dosage (phosphate 0,05 M pH 7,5 enrichi de 1 g/l de gélatine). La limite de sensibilité du dosage se situe à 4 pg par tube, soit à 10 pg par hypothalamus par intervalle de temps étudié.

*Résultats.* — La figure 2 représente les quantités de GnRH libérées par hypothalamus durant chaque période consécutive de 15 minutes (partie supérieure) ou 5 minutes (partie inférieure), pendant 150 minutes. Lorsque le milieu est renouvelé toutes les 15 minutes, trois pics successifs de libération sont observés en l'espace de 2 heures. L'intervalle de temps moyen ( $\pm 1$  DS) entre deux pics est de  $54 \pm 10$  minutes ( $n = 12$ ) et la libération horaire moyenne ( $\pm 1$  DS) de GnRH atteint  $135 \pm 38$  pg.

Lorsque le milieu est renouvelé toutes les 5 minutes, il apparaît qu'à 3 à 5 reprises durant l'observation, la quantité de GnRH libérée augmente brusquement et diminue entre-temps à des valeurs inférieures à la limite de sensibilité du dosage. Dans ce cas, l'intervalle moyen ( $\pm 1$  DS) entre les pics est de  $33 \pm 12$  minutes ( $n = 13$ ) et la libération horaire moyenne ( $\pm 1$  DS) de GnRH est de  $199 \pm 18$  pg.

*Discussion.* — Le présent travail démontre le caractère spontanément intermittent de la libération de GnRH par l'hypothalamus isolé *in vitro*. Plusieurs différences apparaissent selon que la libération dans le milieu est étudiée durant des périodes de 15 ou 5 minutes. Lorsque les prélèvements sont plus espacés, les pics de libération sont moins marqués de même que la diminution de la libération entre ceux-ci. Il est possible qu'en l'espace de 15 minutes, les augmentations et diminutions de la libération de GnRH soient cumulées, étant donné la demi-vie courte du peptide, voisine de 5 minutes (15).

Par ailleurs, la quantité moyenne libérée estimée par quatre prélèvements/heure, est inférieure de 32 % à celle estimée par 12 prélèvements/heure. Cette différence peut correspondre à un écart entre les quantités de GnRH réellement libérées ou encore à une dégradation de GnRH par les endopeptidases hypothalamiques, ce phénomène s'accroissant avec le temps (16). Une troisième différence réside en l'espace de temps séparant les pics de libération de GnRH, cet intervalle étant en moyenne de 33 à 54 minutes selon que le milieu est renouvelé toutes les 5 et 15 minutes. Il faut cependant souligner que, dans le dernier cas, les hypothalamus ont été retirés de l'incubateur pendant 3 minutes et replacés à 37°C pendant 12 minutes. Cette manipulation a pu ralentir le métabolisme du tissu et, par conséquent, allonger la période séparant deux pics de libération. Par ailleurs, d'autres auteurs ont souligné l'influence de la température sur la libération de GnRH par l'hypothalamus isolé (17).

Plusieurs auteurs ont étudié *in vitro* la libération de GnRH par des fragments d'hypothalamus du Rat et, notamment, l'éminence médiane. Hormis l'étude de Ramirez et coll. (17), ces expérimentations ont généralement porté sur un temps de 30 minutes c'est-à-dire beaucoup plus

court que dans notre étude (18 à 20). De plus, tous ces travaux rapportent des résultats obtenus avec divers fragments hypothalamiques à savoir l'hypothalamus médiobasal, l'éminence médiane et l'organum vasculosum de la lame terminale. Etant donné que les périodes étudiées par ces auteurs étaient de courte durée (30 minutes) avec des prélèvements étagés toutes les 10 minutes, il n'est pas possible de conclure quant au mode pulsatile ou non de libération de GnRH par les divers fragments hypothalamiques.

Des études complémentaires sont donc nécessaires, d'une part, afin de préciser si le phénomène rapporté ici persiste lorsque des fragments hypothalamiques particuliers sont étudiés, et, d'autre part, pour déterminer plus finement la fréquence avec laquelle la libération de GnRH survient. Quoi qu'il en soit, ces observations incitent à considérer avec prudence le modèle expérimental que constitue l'hypothalamus *in vitro* lorsqu'on étudie les variations de la libération de GnRH induites par diverses substances ou divers stimulus.

Malgré l'absence d'hormones hypophysaires ou gonadiques assurée par ces études *in vitro*, plusieurs difficultés sont rencontrées dans ce modèle expérimental complexe : en effet, l'hypothalamus prélevé contient certains éléments cellulaires incomplets à savoir les axones de certains neurones peptidergiques dont les périkaryons ne sont que partiellement et difficilement localisés (21). De plus, des neurotransmetteurs labiles et d'autres médiateurs tels que les prostaglandines modulent de manière variable la GnRH contenue et libérée dans les diverses régions hypothalamiques intéressées (17 à 20, 22 à 25). Enfin, au delà de ces facteurs anatomiques et biochimiques, probablement impliqués dans la régulation de la sécrétion de GnRH, l'importance de facteurs non spécifiques tels que la concentration locale en calcium et en potassium a été démontrée (4, 17, 19, 24, 26). De toute manière, les variations observées dans cette étude surviennent en l'absence de toute modification du milieu de culture au cours de l'expérience et suggèrent ainsi le caractère intrinsèque du mécanisme induisant la libération pulsatile de GnRH, en l'absence d'afférences extrahypothalamiques.

Cette observation peut être comparée à celle faite *in vivo* après déafférentiation de l'hypothalamus. Il ressort que la déafférentiation antérieure située entre le chiasma et le noyau arqué ou la liaison de la région préoptique diminue la quantité de GnRH contenue au niveau de l'hypothalamus médiobasal (21, 27 à 31) et la sécrétion des gonadotrophines notamment en réponse à la castration chez le Rat (28). Cependant, le caractère pulsatile de la sécrétion de LH est irrégulièrement ou pas affecté par semblable lésion, pour autant que l'intégrité du noyau arqué soit respectée (8, 32 à 34). La pulsatilité ne semble donc pas soumise au contrôle stimulant obligatoire de la région hypothalamique antérieure. Au contraire, une inhibition de la LH et de sa pulsatilité a été observée après stimulation du noyau suprachiasmatique ou de la région préoptique (35, 36). En revanche, cette région semble nécessaire au maintien d'une sécrétion cyclique des gonadotrophines chez le Rat et, par là, à l'induction de l'ovulation (30, 37 à 39).

Un dernier élément d'intérêt potentiel du modèle expérimental étudié est l'investigation de la maturation hypothalamique en fonction de

l'âge ; en effet, les mécanismes neuro-endocriniens semblent déterminants dans l'induction de la puberté (7). Une des expressions biologiques de cette maturation est l'apparition d'une sécrétion pulsatile de LH probablement déterminée par un mode similaire de libération de GnRH. L'étude de ce phénomène *in vitro* peut constituer une approche dans la compréhension des mécanismes induisant la maturation sexuelle (\*).

## BIBLIOGRAPHIE.

1. Gay V. L. & Sheth N. A., *Endocrinology*, 1972, 90, 158.
2. Blake C. A., *Endocrinology*, 1974, 95, 813.
3. Carmel P. W., Araki S. & Ferin M., *Endocrinology*, 1976, 99, 243.
4. Levine J. E. & Ramirez V. D., *Endocrinology*, 1980, 107, 1782.
5. Ferin M., Bogumil J., Drewes J., Dyrenfurth I., Jewelewicz R. & Van de Wiele R. L., *Acta Endocr.*, 1978, 89, 48.
6. Knobil E., Plant T. M., Wildt L., Belchetz P. E. & Marshall G., *Science*, 1980, 207, 1371.
7. Wildt L., Marshall G. & Knobil E., *Science*, 1980, 207, 1373.
8. Nansel D. D. & Trent D. F., *Endocrinology*, 1979, 104, 532.
9. Soper B. D. & Weick R. F., *Endocrinology*, 1980, 106, 348.
10. Bourguignon J. P., Burger H. G. & Franchimont P., *Clin. Endocr.*, 1974, 3, 437.
11. Bourguignon J. P. & Franchimont P., *Acta Endocr.*, 1976, 86, 15.
12. Bourguignon J. P., Hoyoux C., Reuter A. & Franchimont P., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1979, 48, 78.
13. Nett T. M., Akbar A. M., Niswender G. D., Hedlund M. T. & White W. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, 36, 880.
14. Reuter A. M., Hendrick J. C. & Franchimont P., *Ann. Biol. Clin.*, 1973, 31, 479.
15. Burger H. G. & Franchimont P., *Horm. Metab. Res. (suppl.)* 1974, 5, 61.
16. Griffiths E. C., *Horm. Res.*, 1976, 7, 179.
17. Ramirez V. D., Gallardo E. & Hartter D., *J. Endocrinol. Invest.*, 1980, 3, 29.
18. Negro-Vilar A., Ojeda J. R. & Mc Cann S. M., *Endocrinology*, 1979, 104, 1479.
19. Rotsztejn W. H., Charli J. L., Tattou E., Epelbaum J. & Kordon C., *Endocrinology*, 1976, 99, 1663.
20. Rotsztejn W. H., Charli J. L., Pattou E. & Kordon C., *Endocrinology*, 1977, 101, 1475.
21. Sternberger L. A. & Hoffman G. E., *Neuroendocrinology*, 1978, 25, 111.
22. Advis J. P., Mc Cann S. M. & Negro-Vilar A., *Endocrinology*, 1980, 107, 892.
23. Charli J. L., Rotsztejn W. H., Pattou E. & Kordon C., *Neuroscience letters*, 1978, 10, 159.
24. Bennet G. W. & Edwardson J. A., *Endocrinology*, 1975, 65, 33.
25. Linton E. A., Bennet G. W. & Whitehead S. A., *Neuroendocrinology*, 1979, 28, 394.
26. Bigdeli H. & Snyder P. J., *Endocrinology*, 1978, 103, 281.
27. Kalra S. P., *Endocrinology*, 1976, 99, 101.
28. Taleisnik S., Caligaris L., Beltramino C. & Caceres A., *J. Endocr.*, 1978, 77, 11.
29. Wenger T., Kerdelhue B. & Halasz B., *Neuroendocrinology*, 1979, 29, 276.
30. Hayashi S. & Mizukami S., *Neuroendocrinology*, 1979, 28, 145.
31. Brownstein M. J., Arimura A., Schally A. V., Palkovits M. & Kizer J. S., *Endocrinology*, 1976, 98, 662.
32. Blake C. A., Norman R. L. & Sawyer C. H., *Neuroendocrinology*, 1974, 16, 32.
33. Arendash G. W. & Gallo R. V., *Neuroendocr.*, 1978, 27, 204.
34. Blake C. A. & Sawyer C. H., *Endocrinology*, 1974, 94, 730.

(\* ) Travail subventionné par les crédits n° 74039 de l'OMS et n° 3.4501.80 du FRSM.

Les auteurs sont reconnaissants aux Docteurs Nett et Niswender qui ont aimablement fourni l'antisérum anti-GnRH. Ils remercient également le Docteur Sandow pour l'approvisionnement en décapeptide synthétique.

35. Brawer J. R., Ruf K. B. & Naftolin F., *Neuroendocrinology*, 1980, 30, 144.
  36. Gallo R. V., *Neuroendocrinology*, 1980, 31, 161.
  37. Wiegand S. J., Terasawa E., Bridson W. E. & Goy R. W., *Neuroendocrinology*, 1980, 31, 147.
  38. Blake C. A., Scaramuzzi R., Hilliard J. & Sawyer C. H., *Neuroendocrinology*, 1973, 12, 86.
  39. Mosko S. S. & Moore R. Y., *Neuroendocrinology*, 1979, 29, 350.
-