

Endocrinologie.**Applications de l'extraction et du dosage radioimmunologique du LH-RH dans les urines humaines,**

par J. P. BOURGUIGNON, C. DOURCY et P. FRANCHIMONT.

Institut de Médecine, Laboratoire de Radioimmunologie,

23 boulevard Piercot, B 4000 Liège ;

Clinique et Polyclinique des maladies de l'enfance,

69 boulevard de la Constitution, B 4020 Liège.

(reçue le 9 février 1976).

Summary. — The existence of endogenous LHRH like immunoreactivity is shown in human urines after appropriate extraction, by the radioimmunoassay of LHRH. In normally cycling and menopausal women the quantities of endogenous hormone found in urines are greater after acid extraction than those found after extraction at pH 7. Furthermore, the increase observed by extraction in acidified methanol is directly correlated and proportional to the quantity of hormone assayable by extraction at pH 7. The hypothesis of urinary excretion of LHRH as a polymer of immunoreactive units is suggested by this study.

Plusieurs auteurs ont montré précédemment que le LHRH (décapeptide hypothalamique libérant les gonadotrophines) était excrété en faible proportion dans les urines (1, 2, 3). Les quantités décelées dans les conditions basales sont en effet difficiles à interpréter.

Une méthode d'extraction appropriée du LHRH synthétique marqué a été recherchée et mise au point dans les urines (4). Cette méthode d'extraction peut être appliquée à la recherche de substances endogènes urinaires présentant la même immunoréactivité que le LH-RH endogène dans un double but : d'une part, elle permettra de quantifier avec plus de précision l'immunoréactivité endogène du type LHRH excrétée dans les urines. D'autre part, le comportement de cette hormone urinaire au cours de l'extraction pourra être comparé à celui du LHRH synthétique marqué étudié précédemment (4).

(1) Jeffcoate S. L., Holland D. T., Fraser H. M. & Gunn A., *Nature*, 1975, 244, 5412, 161.

(2) Redding T. W., Kastin A. J., Gonzales-Barcena D., Coy D. H., Coy E. J., Schalch D. S. & Schally A. V., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, 37, 626.

(3) Jeffcoate S. L., Greenwood R. H. & Holland D. T., *J. Endocr.*, 1974, 60, 305.

(4) Bourguignon J. P., Dourey C. & Franchimont P., *C. R. Soc. Biol.*, 1976, 170, 194-199.

Matériel et Méthodes. — L'extraction (4) et le dosage radioimmunologique du LHRH (5) ont été décrits précédemment. L'hormone synthétique (Hoeschst) et l'antisérum aimablement fourni par le Docteur Niswender ont été utilisés.

Les diurèses de 24 heures ont été recueillies chez 15 femmes ménopausées âgées de 49 à 89 ans ainsi qu'au cours d'un cycle menstruel complet chez deux femmes adultes normalement réglées. A l'aide de ce matériel, 3 applications ont été réalisées :

1. Des quantités de LHRH synthétique variant de 1 à 125 pg ont été ajoutées à des échantillons de 5 ml d'urine provenant d'une femme normalement réglée, en phase folliculaire. Ces quantités de LHRH étaient identiques à celles utilisées pour établir la courbe de référence du dosage. A partir des différents échantillons d'urines, l'extraction du

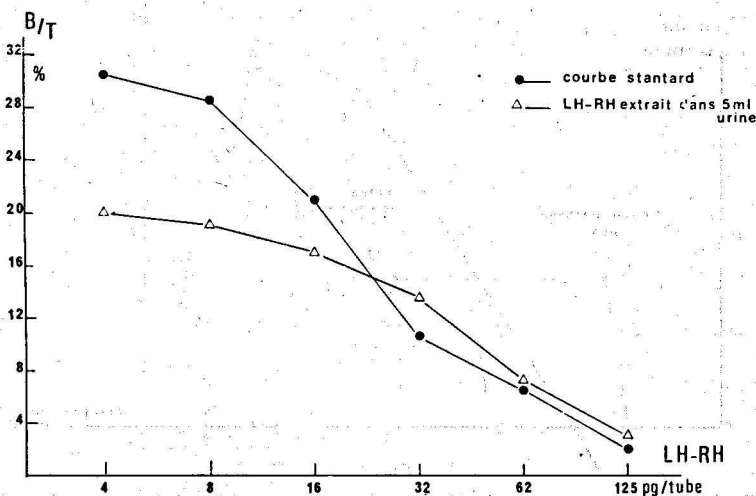


FIG. 1.

Des quantités de 4, 8, 16, 31, 62 et 125 pg de LHRH synthétique ont été extraites dans 5 ml d'urine puis dosées comparativement à des quantités identiques de LHRH dont les points constituent la courbe standard.

LHRH fut réalisée selon la technique décrite précédemment (4) en utilisant du méthanol acidifié à pH 3. Par la suite, les extraits ont été mis en solution dans le tampon utilisé pour le dosage radioimmunologique, et neutralisé avant ce dosage. Les quantités de LHRH décelées ont été comparées à celles de la courbe de référence normale.

2. Dix colonnes de polystyrène (20 × 2 cm) contenant 1,2 g de Sphérosil ont été constituées. Un litre d'urine de femme adulte normale en phase folliculaire a été réparti en 10 échantillons de 100 ml. Chaque

(5) Burger H. & Franchimont P., *in* Radioimmunoassay : methodology and applications in physiology and in clinical studies, G. Thieme publ. Stuttgart, 1974, p. 61.

échantillon de 100 ml a été déposé sur une colonne ; l'éluion de l'immunoréactivité endogène a été réalisée en traitant chaque colonne successivement par 100 ml de méthanol pH 7 puis 100 ml de méthanol acidifié à pH 3. Un échantillon unique de 100 ml a été recueilli lors du passage du méthanol pH 7 tandis que 10 fractions successives de 10 ml ont été recueillies lors de l'éluion par le méthanol à pH 3. Les 10 fractions correspondantes de chaque colonne ont été rassemblées. Ainsi, un aliquot unique de 1000 ml a rassemblé les 10 fractions de 100 ml obtenues avec le méthanol pH 7 et 10 échantillons consécutifs de 100 ml ont été obtenus avec les fractions successives d'éluion par le méthanol pH 3. Ces différents aliquots ont ensuite été évaporés, remis en solution, et neutralisés.

A partir de ces extraits, des dilutions ont été effectuées et le dosage radioimmunologique réalisé.

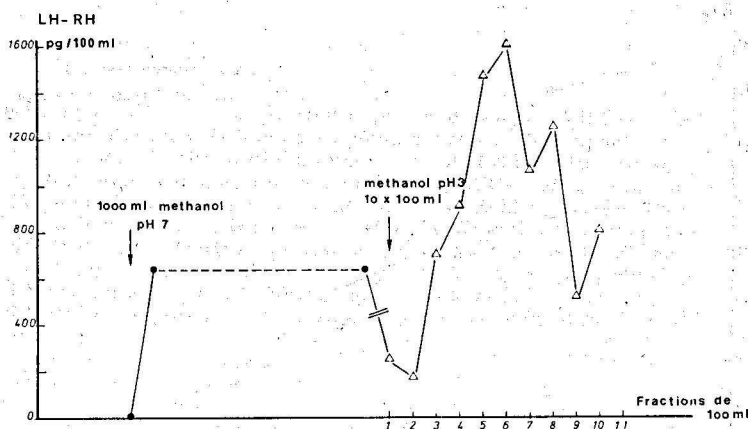


FIG. 2.

Elution de l'immunoréactivité endogène du type LHRH à partir d'un litre d'urine par, successivement, un litre de méthanol pH 7 puis un litre de méthanol pH 3. Dosage radioimmunologique du LHRH dans une fraction unique d'extrait à pH 7 et 10 fractions successives d'extrait à pH 3.

3. A partir des diurèses de 24 heures recueillies chez des femmes adultes normalement réglées et ménopausées, des échantillons de 5 ml ont été extraits comparativement en utilisant du méthanol, soit neutre, soit acidifié à pH 3. Par la suite le dosage radioimmunologique a été réalisé sur ces extraits, préalablement mis en solution et neutralisés par NaOH 0,01 M.

Résultats. — 1. La figure 1 montre la comparaison entre la courbe standard et les différentes quantités de LHRH équivalentes mises en solution dans de l'urine humaine normale et ensuite extraites de cette urine. Lorsque la quantité de LHRH est égale ou inférieure à 16 pg/tube, on observe dans les extraits d'urine des quantités d'immunoréactivité supérieures à celle de l'hormone synthétique ajoutée à

l'urine. Cette différence observée pour de faibles quantités d'hormone est probablement due à l'interférence de l'immunoréactivité endogène présente dans l'urine. Par contre, lorsque la quantité d'hormone synthétique dépasse 16 pg/tube, l'immunoréactivité extraite des urines devient inférieure aux quantités de la courbe de référence. Le rendement de l'extraction de LHRH synthétique froid de l'urine a pu être calculé comme variant entre 73 et 79 %, en tenant compte de l'interférence de l'hormone endogène urinaire qui est également mise en évidence par le dosage radioimmunologique.

2. La figure 2 illustre l'éluion de l'immunoréactivité endogène du type LHRH à partir d'un litre d'urine. Lors de l'éluion par le méthanol pH 7, une première fraction d'immunoréactivité est recueillie

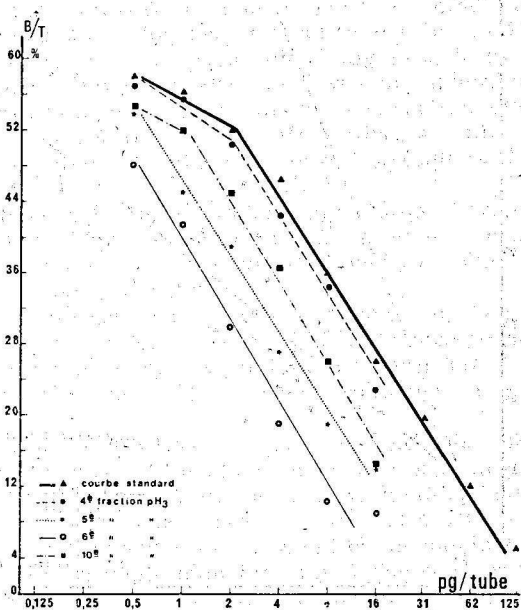


FIG. 3.

Courbe standard du dosage radioimmunologique du LHRH et courbes comparatives de dilution des fractions obtenues lors de l'éluion du LHRH urinaire endogène par le méthanol pH 3.

(6,4 ng/litre). Une seconde fraction un peu plus importante (8,8 ng/litre) est obtenue avec le méthanol acidifié à pH 3. Au cours de cette élution, on observe une augmentation progressive des quantités décelées dans chaque fraction de 100 ml ; avec une élution maximale à la 6^e fraction (1.600 pg/100 ml). Chaque fraction a fait l'objet de plusieurs dilutions pour le dosage radioimmunologique, et les courbes ainsi obtenues sont parallèles à la courbe standard. Certaines d'entre elles sont montrées à titre d'exemple à la fig. 3.

3. Les quantités de LHRH urinaire excrétées au cours de 24 heures diffèrent significativement selon que l'extraction a été effectuée avec du méthanol à pH 7 ou à pH 3. Cette différence est observée aussi bien chez la femme normalement réglée qu'à la ménopause, et les résultats sont significativement plus élevés lorsque l'éluion de l'hormone est réalisée par du méthanol acidifié (fig. 4).

De plus, les résultats obtenus après extraction à pH 7 montrent des valeurs significativement inférieures chez la femme ménopausée par

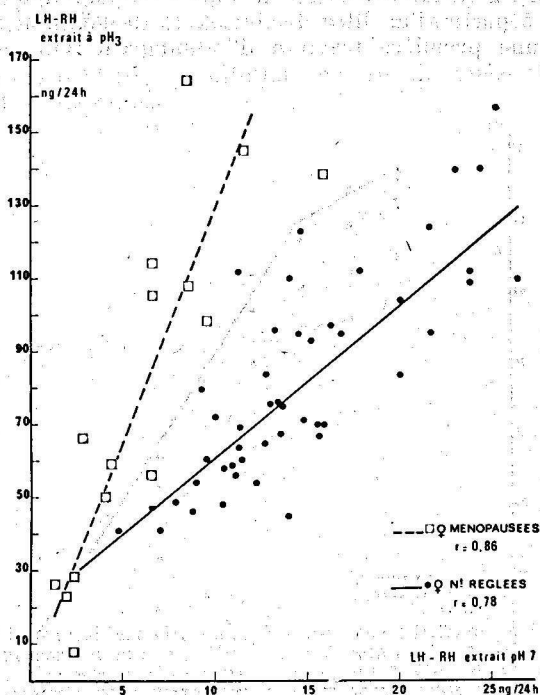


FIG. 4.

Corrélation entre les quantités d'immunoréactivité du type LHRH excrétée dans les urines de 24 heures, et dosées après extraction par le méthanol à pH 7 et à pH 3, au cours de deux cycles menstruels normaux, et à la ménopause.

rapport aux valeurs obtenues chez la femme normalement réglée. Par contre, après extraction à pH 3, il n'y a plus de différence et la dispersion des valeurs individuelles est large.

Enfin, la comparaison des résultats obtenus aux deux différents pH indique l'existence d'une corrélation significative entre les valeurs obtenues à pH 7 et celles obtenues à pH 3, tant chez la femme normalement réglée ($r = 0,78$) que chez la femme ménopausée ($r = 0,86$).

Conclusion et Discussion. — Nous avons montré, dans cette étude, l'application d'une technique d'extraction originale à l'éluion d'hormone synthétique (LHRH) dans les urines humaines, avec un rendement semblable à celui obtenu avec l'hormone marquée (4). De plus, il apparaît de nos observations qu'il existe de l'hormone endogène dans les urines, décelable par la méthode d'extraction et le dosage radioimmunologique, et interférant avec l'hormone synthétique ajoutée à l'urine.

D'autre part, nous confirmons la présence d'hormone immunoréactive excrétée dans les urines humaines en l'absence de toute administration de LHRH synthétique exogène. L'étude de l'hormone endogène apparaît différente de celle de l'hormone marquée (4) ; en effet, elle est partiellement éluee par le méthanol à pH 7 tandis que l'hormone marquée ne l'est pas. Nous avons montré que le comportement immunologique de l'hormone endogène est parallèle à celui du LHRH synthétique. Enfin, dans deux situations physiologiques, le cycle menstruel et la ménopause, nous avons observé l'existence d'hormone endogène décelable à des taux plus élevés lorsque l'extraction est réalisée par du méthanol acidifié plutôt qu'à pH neutre. De plus, nous avons observé une corrélation significative entre les résultats obtenus à pH 7 et à pH 3.

S. L. Jeffcoate et Diane T. Holland ont étudié l'hormone endogène urinaire et observé que le comportement de cette hormone au cours de chromatographie sur carboxyméthyl cellulose était semblable à celui du 2-10 nonapeptide (6).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées sur la base des deux observations suivantes de cette étude : 1) il y a accroissement des taux d'hormone décelables après extraction en milieu acide ; 2) cette augmentation est proportionnelle aux valeurs obtenues après extraction à pH neutre.

Il est possible que le LHRH soit en partie adsorbé sur les mucines urinaires à pH neutre, et ce phénomène d'adsorption pourrait diminuer lors de l'acidification du milieu. Néanmoins, dans ce cas, la corrélation entre les valeurs trouvées à pH 7 et à pH 3 serait fonction des variations individuelles de la quantité de mucines urinaires, et pourrait être très variable d'un individu à l'autre. Par ailleurs, il est possible que le LHRH soit excrété dans les urines sous la forme d'un polymère unissant des unités peptidiques immunoréactives par des liaisons faibles que l'acidification modifierait. Des études ultérieures biologiques et physico-chimiques du peptide endogène excrété dans les urines, après extraction de ce milieu, seraient utiles pour préciser sa nature.

Résumé. — La présence dans les urines d'hormone endogène présentant une immunoréactivité du type LHRH est démontrée, après extraction appropriée, par le dosage radioimmunologique de LHRH. Chez la femme normalement réglée et à la ménopause, les quantités d'hormone endogène décelées dans les urines sont plus importantes après extraction en milieu acide qu'après extraction à pH neutre et l'accroissement provoqué par l'extraction en méthanol acidifié est

directement proportionnel à la quantité d'hormone décelable par extraction à pH neutre. L'hypothèse de l'existence d'excrétion urinaire du LHRH sous forme de polymère est suggérée par cette étude.

Endocrinologie.

Etude histochimique de la cortico-surrénale du Rat après épiphysectomie,

par J. ZIEGELS, V. DEVECKERSKI et P. Y. DUCHESNE.

*Laboratoire d'Anatomie de l'Université de Liège
et Institut d'Histologie et d'Embryologie de Novi Sad.*

(reçue le 9 février 1976).

Summary. — The authors investigate the effects of pinealectomy on male rat's adrenal cortex. Fat material accumulates in the fascicular and reticular zones; different enzyme activities show light variations in operated animals. The frequent presence of mitochondrial multilamellar structures in pinealectomized rats is discussed.

L'épiphyse joue, d'une part, un rôle dans le développement des gonades (1*, 2*) et, d'autre part, elle serait impliquée dans le métabolisme hydro-salin et la régulation de la production d'aldostérone (3*). Toutefois, si les auteurs s'accordent en général sur les relations inhibitrices réciproques entre l'épiphyse et les gonades, les rapports épiphyse-zone glomérulaire sont davantage controversés. Les auteurs présentent des arguments tantôt favorables, tantôt défavorables à cette