

Endocrinologie.

**Mise au point de l'extraction du LHRH dans les urines humaines :  
étude de l'extraction de l'hormone synthétique marquée,**

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

*Institut de Médecine, Laboratoire de Radioimmunologie,  
23 boulevard Piercot, B 4000 Liège,  
Clinique et Policlinique des Maladies de l'Enfance,  
69 boulevard de la Constitution, B 4020 Liège.*

(reçue le 9 février 1976).

**Summary.** — A method of extraction of synthetic LHRH is studied in human urines, using porous glass (Spherosil) and methanol. In the defined conditions the yield is greater than 80 %. It appears that the method is reproducible. The recovery varies essentially with the quantity of Spherosil and the pH of methanol. The use of methanol acidified at pH 3 increases the speed and the importance of labelled LHRH recovery.

Le développement d'un dosage radioimmunologique du LHRH (décapeptide hypothalamique libérant les gonadotrophines) (1\* à 4\*) a permis la mise en évidence dans le sérum humain de quantités très variables de cette hormone immunoréactive, en raison notamment de la demi-vie très courte de ce peptide dans le milieu sérique (5\*, 6\*, 7\*). Dès lors, les valeurs obtenues dans le sérum sont difficiles à interpréter dans les conditions basales.

(1\*) Nett T. M., Akbar A. M., Niswender G. D., Hedlund M. T. & White W. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, 36, 880.

(2\*) Jeffcoate S. L., Fraser H. M., Gunn A. & Holland D. T., *J. Endocr.*, 1973, 57, 189.

(3\*) Jutisz M. & Kerdelhue B., in *Proceedings of the International Congress of hypothalamic hypophysiotropic Hormones, Mexico 1972, Excerpta Medica Amsterdam*, p. 174.

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

(5\*) 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.

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

(7\*) Kelch R. P., Clemens L. E., Markovs M., Westhoff M. H. & Hawkin D. W., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1975, 40, 53.

La présence d'immunoréactivité du type LHRH dans les urines humaines a été précédemment démontrée et étudiée (8\*, 9\*) essentiellement après excrétion urinaire du composé synthétique injecté par voie intraveineuse. Par contre, dans les conditions basales, l'excrétion de l'hormone endogène dans des urines non extraites, existe, mais à des taux souvent inférieurs à la limite de sensibilité de la plupart des dosages. Pour ces raisons diverses, nous avons mis au point une méthode d'extraction du LHRH dans les urines humaines, de façon à quantifier l'immunoréactivité du LHRH endogène excrété dans les urines.

**Matériel et Méthodes.** — A. RÉACTIFS. — L'hormone synthétique (Hoeschst) a été marquée à l'iode 125 par la méthode à la chloramine T et au métabisulfite, décrite précédemment (4\*).

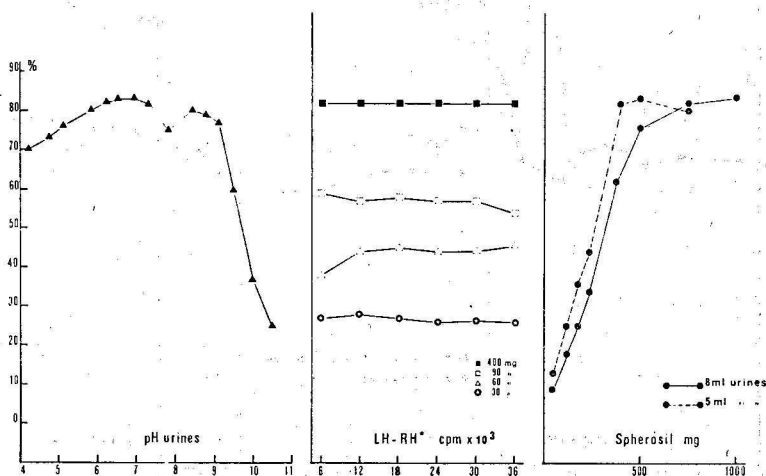


FIG. 1.

Fixation de LHRH\* au Sphérosil en fonction du pH urinaire (5 ml urines + 500 mg Sphérosil), en fonction de la quantité de LHRH\* (dans 5 ml d'urine + 30, 60, 90 ou 400 mg Sphérosil), en fonction de la quantité de Sphérosil (15.000 cpm LHRH\* dans 5 ou 8 ml d'urine).

Le milieu d'extraction utilisé est toujours constitué d'urines fraîchement émises de femmes normalement réglées en phase folliculaire.

L'agent de fixation est le Sphérosil type A. Il s'agit d'un silicate synthétique composé de molécules ayant une taille de 100 à 200 microns et une surface de 350 à 500 m<sup>2</sup> par gramme (10\*). Ce matériel est préalablement activé par haute température (400°C pendant 6 heures). Pour être ajouté au milieu biologique d'extraction (urines), il est mis en suspension dans du tampon PO<sub>4</sub>, 0,05 M.

(8\*) Jeffcoat S. L., Holland D. T., Fraser H. M. & Gunn A., *Nature*, 1973, 5412, 161.

(9\*) Jeffcoat S. L. & Holland D. T., *Acta Endocrinologica*, 1975, 78, 232.

(10\*) Ratcliffe J. G. & Edwards C. R. W., *Radioimmunoassay Methods*, ed. by K. E. Kirkham and W. M. Hunter, publ. by Churchill Livingstone Edinburgh and London, 1971, p. 502.

L'agent de récupération est constitué par du méthanol. Celui-ci a été utilisé, soit à pH neutre, soit acidifié à pH 3. Dans ce cas, l'acidification a été réalisée par addition d'acide acétique glacial (17 N).

B. EXTRACTION. — Les manipulations d'extraction de l'hormone marquée ont été réalisées en triple. La séquence suivante a été effectuée dans des récipients de matière plastique, en deux temps :

1. *Fixation.* — L'hormone marquée en solution dans du tampon est ajoutée à l'urine. Ce mélange est ensuite additionné de Sphérosil. Après incubation de ces trois constituants, une centrifugation pendant 10 minutes à température ordinaire sépare le Sphérosil du surnageant, qui est alors décanté.

Cette opération a été étudiée en fonction des variables suivantes :

1) le pH de l'urine au départ de l'expérimentation, modifié par addi-

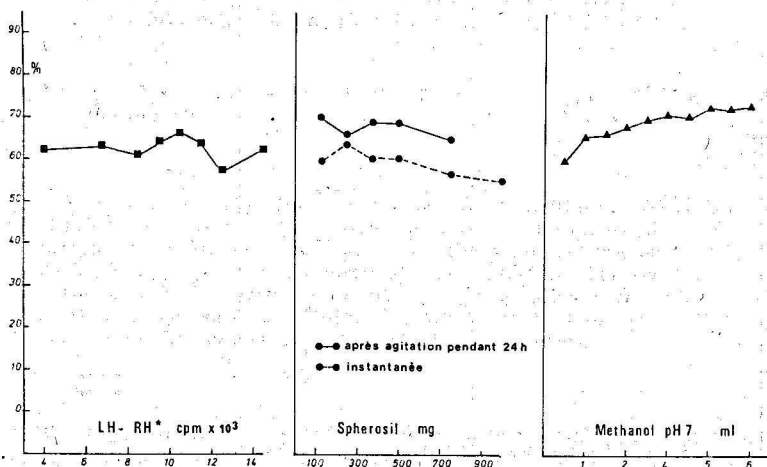


FIG. 2.

Récupération de LHRH\* par le méthanol à pH 7 en fonction de la quantité de LHRH\* (dans 5 ml de méthanol), en fonction de la quantité de Sphérosil (récupération instantanée ou après agitation pendant 24 heures dans 5 ml méthanol), en fonction de la quantité de méthanol (récupération de 15.000 cpm LHRH\* fixé préalablement à 500 mg de Sphérosil).

tion de NaOH ou HCl N ; 2) la quantité d'hormone marquée c'est-à-dire la radioactivité additionnée à l'urine ; 3) la quantité de Sphérosil utilisée ; 4) la durée d'incubation du mélange de ces différents constituants.

2. *Récupération.* — Le LHRH\* (\*) adsorbé sur le culot de Sphérosil est remis en solution dans du méthanol. Après une incubation de durée variable, ce mélange est centrifugé pendant 10 minutes à température ordinaire. Le méthanol est alors séparé du Sphérosil et évaporé à 20°C. L'extrait ainsi obtenu est remis en solution dans le tampon utilisé

(\*) LHRH\* = LHRH marqué.

pour le dosage radioimmunologique ( $\text{PO}_4$  0,05 M + 1 % gélatine + NaCl 0,15 M). Dans le cas de récupération avec le méthanol acidifié, le pH de l'extrait remis en solution est neutralisé si nécessaire par NaOH 0,01 N.

Au cours de la récupération, les variables suivantes ont été étudiées : 1) la quantité d'hormone marquée préalablement adsorbée sur le Sphérosil ; 2) la quantité de Sphérosil utilisée ; 3) la quantité de méthanol additionnée au mélange Sphérosil-hormone marquée ; 4) les conditions

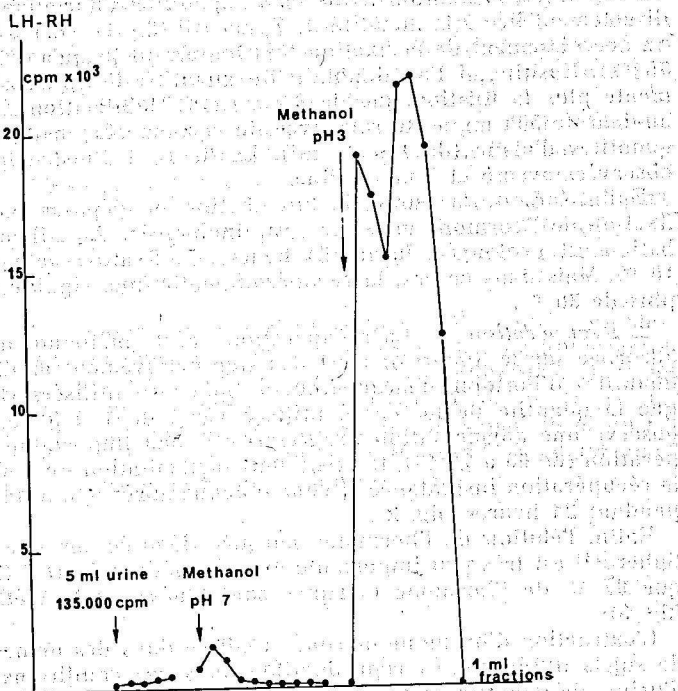


FIG. 3.

Elution de 135.000 cpm LHRH\* dans 5 ml d'urine à partir d'une colonne contenant 600 mg de Sphérosil et traitée successivement par 10 ml de méthanol pH 7 puis 10 ml de méthanol pH 3.

d'incubation du Sphérosil avec le méthanol ; 5) le pH de ce méthanol utilisé, soit à pH neutre, soit à pH 3 après addition d'acide acétique glacial.

Afin d'étudier les variations en fonction du pH du méthanol, une colonne de polypropylène contenant 500 mg de Sphérosil a été réalisée. Successivement, 5 ml d'urine contenant 135.000 cpm de LHRH\*, puis 10 ml de méthanol pH 7 et enfin 10 ml de méthanol pH 3 ont été déposés sur la colonne. Des fractions de 1 ml ont été recueillies.

**Résultats. — 1. FIXATION.** — La fixation de l'hormone marquée varie avec le pH de l'urine utilisée comme milieu d'extraction. Elle diminue nettement en milieu très alcalin (pH supérieur ou égal à 9). Elle est maximale (supérieur à 80 %) entre les pH 6 et 7,5 (fig. 1).

D'autre part, pour une même quantité de Sphérosil, lorsqu'on ajoute à l'urine des quantités variables d'hormone marquée, on observe toujours un même pourcentage de fixation (fig. 1). Ce phénomène est indépendant de la quantité de Sphérosil utilisée. Quelle que soit la quantité d'hormone marquée, sa fixation se réalise toujours dans les mêmes proportions.

Par contre, la fixation d'une même quantité d'hormone marquée est directement liée à la quantité de Sphérosil (fig. 1). On observe en effet un accroissement de la fixation très important jusqu'à 500 mg (de 9 à 75 %). Ensuite, si l'on double cette quantité de Sphérosil, on n'augmente plus la fixation que de 8 %. Cette stabilisation de la fixation au-delà de 500 mg a été retrouvée de la même façon dans différentes quantités d'urine (de 1 à 10 ml). La figure 1 illustre les variations observées avec 5 et 8 ml d'urine.

Enfin, lorsque la durée de l'incubation ne dépasse pas 30 mn, la fixation de l'hormone marquée reste inchangée. Par ailleurs, si l'incubation est prolongée durant 24 heures, la fixation augmente de 5 à 10 %. Mais dans ce cas, la récupération diminue significativement de plus de 30 %.

**2. Récupération.** — La récupération par le méthanol de l'hormone adsorbée sur le Sphérosil n'est pas significativement modifiée par les quantités d'hormone marquée ou de Sphérosil utilisées (fig. 2). Lorsque la quantité de méthanol utilisée varie de 1 à 5 ml (fig. 2), on observe une augmentation progressive et peu importante de la récupération (de 66 à 73 %). Il existe une augmentation de 2 à 10 % entre la récupération instantanée et celle obtenue après agitation du mélange pendant 24 heures (fig. 2).

Enfin, l'éluion de l'hormone marquée déposée sur une colonne de Sphérosil est très peu importante avec le méthanol pH 7 (3 %) tandis que 97 % de l'hormone marquée sont élués par le méthanol pH 3 (fig. 3).

L'extraction d'hormone marquée réalisée dans des urines provenant de sujets différents est reproductible dans ces conditions de volume d'urine, de quantité de Sphérosil, et de pH.

L'étude de l'urine humaine avant et après extraction a montré que les taux d'urée, sodium, potassium, chlore, calcium, phosphore et l'osmolarité étaient inchangés, la créatinine diminuée (de 70,5 à 63,8 mg/100 ml) de même que l'acide urique (de 0,75 à 0,45 mg/ml).

**Discussion et Conclusion.** — De notre étude, il apparaît que l'utilisation du Sphérosil et du méthanol permet l'extraction d'hormone marquée dans l'urine humaine. Les conditions idéales d'extraction peuvent être définies par l'utilisation d'urines à pH 6,5 additionnées de 600 mg de Sphérosil, et centrifugées endéans les 30 minutes. La fixation est supérieure à 80 % dans ces conditions. La meilleure récupération est obtenue avec le méthanol acidifié : nous avons fixé les conditions de récupération à l'utilisation de 8 ml de méthanol acidifié à pH 3, agité avec le Sphérosil pendant une durée minimale de 30 minutes.

Dans ces conditions, le rendement global de l'extraction est supérieur à 80 %. La déperdition de la radioactivité se situe essentiellement au moment de la fixation. Il est possible que cette quantité non fixée au départ, soit constituée par de l'hormone dégradée au moment du marquage.

De plus, cette étude démontre que l'extraction du LHRH est réalisable dans l'urine humaine et qu'elle est reproductible avec des urines provenant de sujets différents.

Enfin, le pH du méthanol apparaît être un élément déterminant de la méthode : la récupération du LHRH synthétique marqué par le méthanol acidifié est plus rapide et plus importante qu'avec le méthanol pH 7. Il faut noter à ce sujet que le LHRH est stable en milieu acide, de même que le Sphérosil (10\*). La meilleure récupération en milieu acide ne semble donc pas attribuable à des modifications isolées de la molécule de LHRH marqué ou du Sphérosil.

D'autres études sont indispensables pour préciser l'extraction de LHRH endogène urinaire. En effet le marquage du LHRH par une molécule d'iode 125 est susceptible de modifier son comportement physico-chimique par rapport à celui de l'hormone froide. D'autre part, la nature et les propriétés du composé endogène immunoréactif pourraient être différentes de l'hormone native et utilement comparées à celles de l'hormone synthétique marquée.

**Résumé.** — Une technique d'extraction du LHRH synthétique marqué est mise au point dans les urines, par l'utilisation de Sphérosil et de méthanol. Il apparaît que la méthode est reproductible. Dans les conditions définies, le rendement est supérieur à 80 %. Il est par ailleurs essentiellement fonction de la quantité de Sphérosil et du pH du méthanol ; l'utilisation de méthanol acidifié à pH 3 augmente la vitesse et l'importance de la récupération de LHRH\*.