

Dosage de l'hormone placentaire somatotrope et mammotrope bovine par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires *

J.F. BECKERS, F. ECTORS

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

RESUME

Le marquage de la H.P.S.M. bovine à l'iode 125 selon la méthode à la lactoperoxydase a permis la mise au point de son dosage par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires hépatiques et mammaires de lapines gestantes. Ces systèmes ont été utilisés avec succès pour comparer la H.P.S.M. purifiée et l'hormone native présente dans les cotylédons ainsi que pour déterminer la teneur en H.P.S.M. des cotylédons fœtaux et maternels.

INTRODUCTION

Récemment nous avons décrit une méthode d'isolement de l'Hormone Placentaire Somatotrope et Mammotrope (H.P.S.M.) à partir des cotylédons fœtaux de bovins, (Beckers J.F. et coll., 1980). Cette hormone est apparentée à la fois à la Prolactine et à l'Hormone de

Croissance. Pour en suivre la purification nous devons disposer d'un système de dosage rapide et sensible de sorte que nous avons eu recours à la méthode par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires.

Ne disposant pas, au départ, de préparation d'H.P.S.M. purifiée nous avons suivi son enrichissement par des mesures séparées de ses deux activités. Ainsi que nous l'avons déjà signalé, ces méthodes ne permettent qu'une mesure approximative de la concentration en H.P.S.M.

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

parce que les courbes de compétition de cette dernière ne sont pas parallèles à la courbe standard du dosage utilisé.

En possession de la H.P.S.M. hautement purifiée, nous avons mis au point le marquage de celle-ci à l'iode 125 et ensuite établi deux systèmes de dosages par liaison radio-compétitive aux récepteurs hépatiques et mammaires de lapines gestantes.

Rappelons brièvement que le principe de ces dosages repose sur l'organisation d'une compétition entre l'hormone marquée (radioactive) et non marquée (froide) pour la liaison aux récepteurs membranaires préparés par ultra-centrifugation d'un broyat cellulaire du tissu cible.

Le principe de cette technique est apparenté à la méthode radioimmunologique.

MATERIEL ET METHODES

Le marquage de la H.P.S.M. bovine est réalisé à l'iode 125 suivant la technique à la lactoperoxydase de Thorell et Johanson (1971). Comme seule modification nous avons réduit à 5 µg la quantité d'hormone introduite dans le milieu.

Les récepteurs membranaires sont préparés selon les méthodes de Shiu et coll. (1973) et Tsushima & Friesen (1973). La Prolactine et l'Hormone de Croissance nous ont été fournies par le N.I.H. (Bethesda-Maryland) *. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Lowry et coll. (1951). Les suspensions tissulaires sont au préalable solubilisées en faisant agir durant 30 minutes du sodium dodécyl sulfate à la concentration de 75 µg/ml.

Pour tous les dosages par liaison aux récepteurs membranaires, les dilutions sont effectuées en tampon Tris-HCl 0,025 M ; MgCl₂ 0,010 M ; pH 7,6 ; b.S.A. 0,1 % ; sulfate de néomycine 0,01 %. Les cotylé-

dons fœtaux et maternels sont broyés pendant environ une minute au moyen d'un mixer de ménage et extraits en tampon glycine 0,05 M ajusté à pH 7,5 par de l'hydroxyde de sodium et additionné de chlorure de sodium 9 g/l dans un rapport poids/volume de 1/5. L'extraction est poursuivie pendant une heure à la température de 4 °C, puis la solution est clarifiée par centrifugation à 13 000 g pendant 40 minutes à 4 °C.

L'interprétation statistique des résultats des dosages consiste :

1. en la détermination des pentes des courbes d'inhibition ;
2. dans le test de la signification des différences entre les pentes obtenues avec les diverses préparations comparées d'une part et la pente de la courbe de référence d'autre part (test de t.) (Rodbard D. et coll. 1970, 1973, 1974 **).

RESULTATS

1) Dosage de la H.P.S.M. par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires

A. Récepteurs hépatiques

La H.P.S.M. ayant une activité somatotrope, il était normal qu'elle se lie aux récepteurs préparés à partir du foie. Les conditions du dosage sont précisées dans la légende de la figure 1.

Cette dernière représente le pourcentage de liaison de la H.P.S.M.¹²⁵ en fonction de la quantité d'H.P.S.M.°

* Nous remercions le « National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases » et le « College of American Pathologists » qui nous ont aimablement fourni la Prolactine PRL-NIH-B4 (18,5 U/mg) et l'Hormone de Croissance GH-NIH-B18 (0,85 U/mg).

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

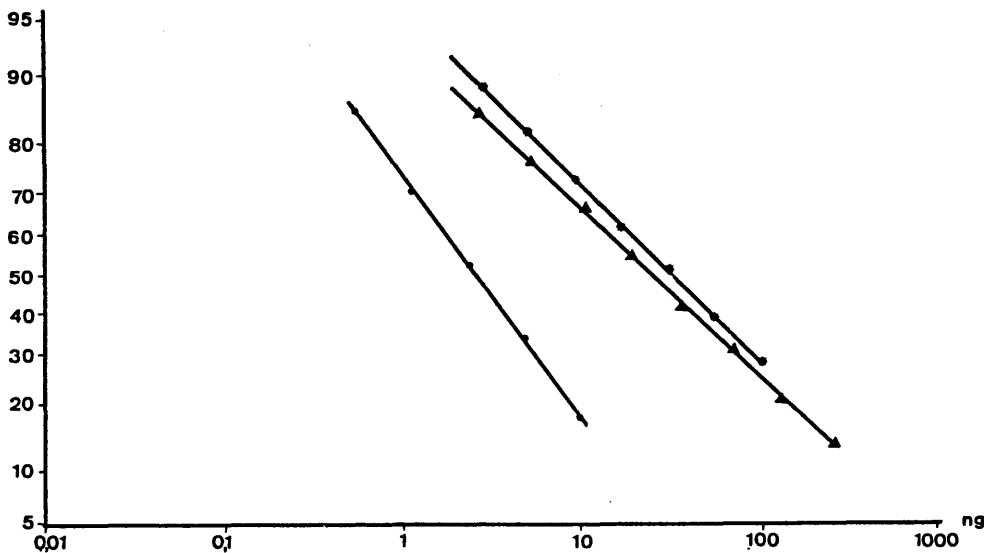


Fig. 1. — Dosage de la H.P.S.M. par liaison radio-compétitive aux récepteurs hépatiques.

- Conditions** : — radioactivité totale ajoutée dans chaque tube : 15 000 cpm
 — 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 140 μ g de protéines (Lowry S.D.S.)
 — volume d'incubation : 500 μ l
 — conditions d'incubation : 16 heures à 20 °C
- Caractéristiques** : — liaison non spécifique : 460 cpm \approx 3 %
 — liaison spécifique de l'hormone marquée en absence d'hormone froide : 22 %
 — liaison spécifique maximum en présence d'un excès de récepteurs (600 μ g de protéines par tube) : 45 %
- En abscisse** : (échelle logarithmique). Quantité d'hormone froide (exprimée en ng/tube) additionnée au milieu.
 • = H.P.S.M. purifiée
 ▲ = Hormone de Croissance N.I.H. - B18
 * = Prolactine N.I.H. - B4
- En ordonnée** : $\text{logit } (B/Bo) \times 100$. H.P.S.M. radioactive liée spécifiquement aux récepteurs (B) par rapport à la liaison en absence d'hormone froide (Bo) $\text{Logit } B/Bo = \ln \left\{ \frac{B/Bo}{1 - B/Bo} \right\}$.

(froide) introduite dans le milieu. Etant donné la double activité de la H.P.S.M., il était intéressant de définir son comportement vis-à-vis des récepteurs hépatiques en présence de Prolactine et d'Hormone de Croissance.

Les courbes d'inhibition obtenues sont très proches l'une de l'autre mais ne sont pas parallèles à la courbe de la H.P.S.M. (cf. tableau n° 1).

Il n'est donc pas possible de comparer les activités de ces trois hormones et il

TABLEAU 1. — Caractéristiques du dosage de la H.P.S.M. par liaison radio-compétitive aux récepteurs hépatiques.

	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 % de la liaison (ng/tube)
H.P.S.M.	- 1,16	2,50 ± 0,05
Prolactine	- 0,82 *	30,6 ± 0,9
Hormone de Croissance	- 0,81 *	25,5 ± 0,7

* Pente significativement différente ($P < 0,05$) de celle obtenue pour la courbe d'inhibition par la H.P.S.M. purifiée.

est probable que la Prolactine et l'Hormone de Croissance occupent le même site avec une affinité différente ou un autre site très voisin affectant ainsi la liaison avec la H.P.S.M.

B. Récepteurs mammaires

La H.P.S.M. présentant une activité apparentée à la Prolactine, il était logique d'utiliser pour le dosage des récepteurs d'origine mammaire.

La figure 2 représente le pourcentage de liaison de la H.P.S.M.¹¹²⁵ en fonction de la quantité d'H.P.S.M.⁰ (froide) introduite dans le milieu.

Le dosage s'avère très sensible pour la H.P.S.M. Par contre, les courbes

d'inhibition de la Prolactine et de l'Hormone de Croissance ne sont pas parallèles à la courbe de la H.P.S.M. (fig. 2 et tableau 2) probablement pour les mêmes motifs que ceux invoqués pour le dosage précédent.

2) Etude comparative de la H.P.S.M. purifiée et de l'hormone native présente dans les cotylédons

Disposant de deux systèmes de dosage, nous avons déterminé la concentration de la H.P.S.M. dans différents extraits de cotylédons de manière à nous assurer que l'hormone purifiée se comporte dans le dosage de manière identique à la H.P.S.M. native présente dans les cotylédons. En effet, notre méthode de puri-

TABLEAU 2. — Caractéristiques du dosage de la H.P.S.M. par liaison radio-compétitive aux récepteurs mammaires.

	Pente	Dose produisant une inhibition de 50 % de la liaison (ng/tube)
H.P.S.M.	- 0,86	0,43 ± 0,01
Prolactine	- 1,03 *	3,12 ± 0,09
Hormone de Croissance	- 0,61 *	257,6 ± 11,62

* Pente significativement différente ($P < 0,05$) de celle obtenue pour la courbe d'inhibition par la H.P.S.M. purifiée.

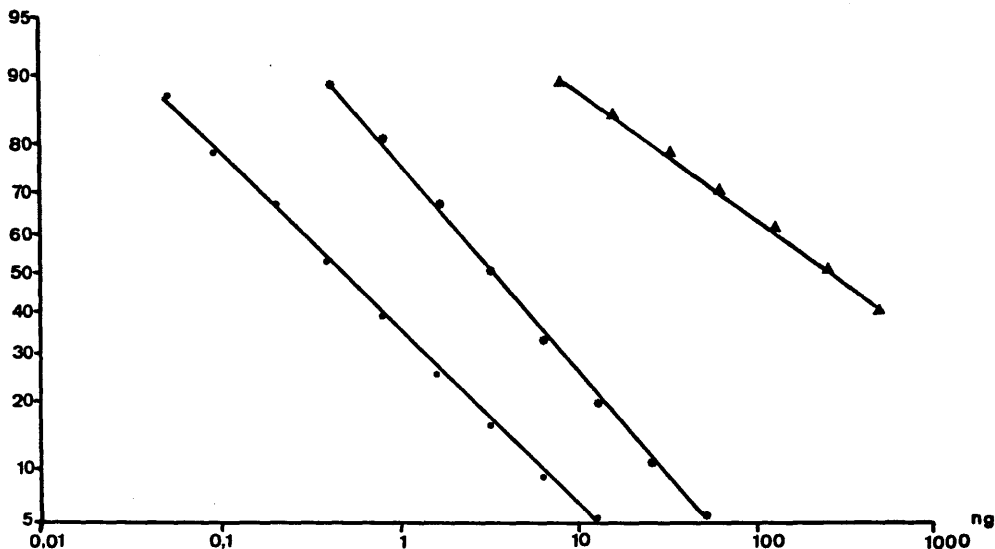


Fig. 2. — Dosage de la H.P.S.M. par liaison radio-compétitive aux récepteurs mammaires.

- Conditions** : — radioactivité totale ajoutée dans chaque tube : 15 000 cpm
 — 100 μ l de suspension de récepteurs correspondant à 180 μ g de protéines (Lowry S.D.S.)
 — volume d'incubation : 500 μ l
 — conditions d'incubation : 16 heures à 20 °C
- Caractéristiques** : — liaison non spécifique : 425 cpm \approx 2,8 %
 — liaison spécifique de l'hormone marquée en absence d'hormone froide : 26 %
 — liaison spécifique maximum en présence d'un excès de récepteurs (700 μ g de protéines par tube) : 50 %
- En abscisse** : (échelle logarithmique). Quantité d'hormone froide (exprimée en ng/tube) additionnée au milieu.
 • = H.P.S.M. purifiée
 ▲ = Hormone de Croissance N.I.H. - B18
 * = Prolactine N.I.H. - B4
- En ordonnée** : $\text{logit } (B/B_0) \times 100$. H.P.S.M. radioactive liée spécifiquement aux récepteurs (B) par rapport à la liaison en absence d'hormone froide (B_0) $\text{Logit } B/B_0 = \ln \left\{ \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} \right\}$.

fication nécessitant de nombreuses étapes aurait pu dénaturer, ne fût que partiellement l'hormone et modifier ainsi l'affinité des récepteurs pour cette dernière.

a) Récepteurs hépatiques

En utilisant le dosage par liaison aux récepteurs hépatiques, l'hormone native

se comporte de manière identique à l'hormone que nous avons purifiée.

Les résultats apparaissent dans la figure 3 et le tableau 3.

b) Récepteurs mammaires

En utilisant le dosage par liaison aux récepteurs mammaires, le comportement

TABLEAU 3. — Liaison radio-compétitive aux récepteurs hépatiques. Etude comparative de la H.P.S.M. purifiée et de l'hormone native présente dans les cotylédons.

	Pente *	Dose produisant une inhibition de 50 % de la liaison (ng de protéines par tube)	Activité par rapport à la préparation d'H.P.S.M. purifiée
1. H.P.S.M.	- 1,16	2,25 ± 0,057	1
2. Extr. de cotyl. fœt.	- 1,05	3 061 ± 95	0,00073
3. Extr. de cotyl. fœt.	- 1,23	3 921 ± 118	0,00057
4. Extr. de cotyl. matern.	- 1,22	27 150 ± 798	0,000082
5. Extr. de cotyl. matern.	- 1,20	32 088 ± 941	0,000070

* Aucune de ces pentes n'est significativement différente de celle de la courbe d'inhibition par la H.P.S.M. purifiée.

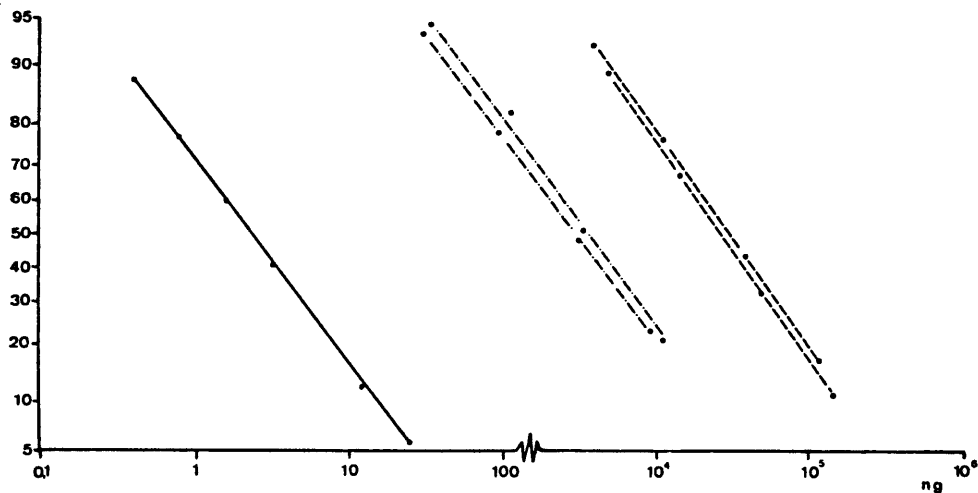


Fig. 3. — Dosage par liaison radio-compétitive aux récepteurs hépatiques : comparaison de la H.P.S.M. purifiée avec l'hormone native.

En abscisse : (échelle logarithmique) : Quantité de protéines (Lowry) exprimée en ng/tube additionnée au milieu.

———— = H.P.S.M. purifiée

----- = extraits de cotylédons fœtaux

- - - - = extraits de cotylédons maternels

En ordonnée : logit (B/Bo) × 100. H.P.S.M. radioactive liée spécifiquement aux récepteurs (B) par rapport à la liaison en absence d'hormone froide (Bo) Logit B/Bo = $\ln \left\{ \frac{B/Bo}{1 - B/Bo} \right\}$.

de l'hormone native est semblable à celui de l'hormone purifiée ainsi que le démontrent la figure 4 et le tableau 4.

Quelque soit le récepteur utilisé, la pente de la courbe obtenue avec l'hormone purifiée n'est pas significativement

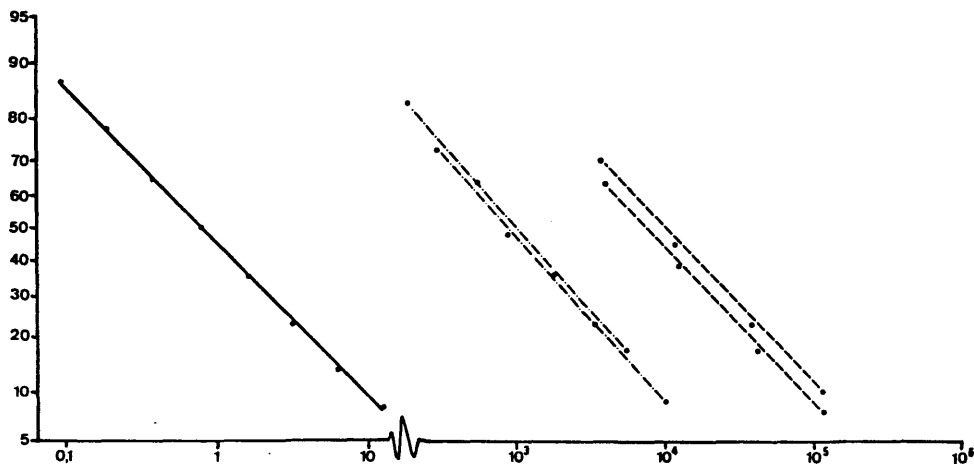


Fig. 4. — Dosage par liaison radio-compétitive aux récepteurs mammaires. Comparaison de la H.P.S.M. purifiée avec l'hormone native.

En abscisse : (échelle logarithmique) : Quantité de protéines (Lowry) exprimée en ng/tube additionnée au milieu.

———— = H.P.S.M. purifiée

----- = extraits de cotylédons fœtaux

- - - - - = extraits de cotylédons maternels

En ordonnée : $\logit (B/Bo) \times 100$. H.P.S.M. radioactive liée spécifiquement aux récepteurs (B) par rapport à la liaison en absence d'hormone froide (Bo) $\logit B/Bo = \ln \{(B/Bo)/(1 - B/Bo)\}$.

TABLEAU 4. — Liaison radio-compétitive aux récepteurs mammaires. Etude comparative de la H.P.S.M. purifiée et de la H.P.S.M. native présente dans les cotylédons.

	Pente *	Dose produisant une inhibition de 50 % de la liaison (ng de protéines par tube)	Activité par rapport à la préparation d'H.P.S.M. purifiée
1. H.P.S.M.	- 0,89	0,82 ± 0,022	1
2. Extr. de cotyl. fœt.	- 0,93	981 ± 33,8	0,00083
3. Extr. de cotyl. fœt.	- 0,95	1 031 ± 33,4	0,00079
4. Extr. de cotyl. matern.	- 0,94	7 995 ± 295	0,00010
5. Extr. de cotyl. matern.	- 0,92	10 549 ± 408	0,000077

* Aucune de ces pentes n'est significativement différente de celle de la courbe d'inhibition par la H.P.S.M. purifiée.

différente de celle obtenue avec les dilutions des extraits de cotylédons. Ce résultat permet de conclure que notre méthode de purification n'a pas dénaturé la H.P.S.M.

3) Dosage de la H.P.S.M. dans les cotylédons

Différents lots de cotylédons fœtaux et maternels provenant de placentas âgés de 3 à 7 mois ont été extraits pendant une heure à pH 7,5 et dosés sur récepteurs hépatiques et mammaires.

Les résultats de ces dosages sont repris dans le tableau 5 :

Les cotylédons fœtaux sont donc plus riches en H.P.S.M. que les cotylédons maternels. Il faut toutefois noter qu'il n'est pas certain que la technique d'extraction que nous avons employée soit totalement efficace de sorte que les teneurs rapportées ci-dessous sont peut-être légèrement inférieures à la réalité.

Nous avons préféré ce mode d'extraction pour être certains de ne pas dénaturer l'hormone.

CONCLUSION

Le marquage de la H.P.S.M. au moyen de l'iode 125 selon la méthode à la lactoperoxydase a permis la mise au point de deux dosages par liaison radio-compétitive aux récepteurs membranaires hépatiques et mammaires de lapine. Ces systèmes permettent de mesurer les concentrations en H.P.S.M. dans les extraits de cotylédons et les différentes fractions obtenues au cours des étapes de la purification.

*
**

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de M^{me} Ch. Fromont-Liénard, M^{me} P. Wouters-Ballman et M. P. Van Der Zwalmen.

TABLEAU 5. — Teneurs de H.P.S.M. (exprimées en mg par kg de tissu) dans les cotylédons fœtaux et maternels.

		Type de dosage	
		Récepteurs hépatiques	Récepteurs mammaires
Cotylédons fœtaux	n° 1.	32,2	37,5
	2.	23,2	21
	3.	11,5	14,2
	4.	39	39,2
	5.	12,5	14,1
Cotylédons maternels	6.	7,5	7
	7.	5,1	4,8
	8.	4,5	3,9
	9.	8	6,7
	10.	8	8,7

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- 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. Statistical Quality Control of Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. *Clin. Chem.*, 1974, **20**, 1255.
- RODBARD D. and FRAZIER G.R. Radioimmunoassay Data Processing 2nd ed. Fortran IV-G, Program Listing (PB 217367) or Magnetic Tape (PB 217366) U.S. Dept. Commerce National Technical Information Service Springfield, Va 1973.
- RODBARD D. and LEWALD J.E. Computer Analysis of Radioligand - Assay and Radioimmunoassay Data. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium Steroid Assay by Protein Binding. March 23-25, 1970.
- SHU R.P.C., KELLY P.A., FRIESEN H.G. Radioreceptor Assay for Prolactin and other Lactogenic Hormones. *Science*, 1973, **180**, 968.
- THORELL J.I. and JOHANSON B.G. Enzymatic Iodination of Polypeptides With I^{125} to High Specific Activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1971, **251**, 363.
- TSUSHIMA T. and FRIESEN H.G. Radioreceptor Assay for Growth Hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, **37**, 334.

SUMMARY

Radioreceptor Assay of Bovine Placental Somatomotropin.

Bovine Placental Somatomotropin was labelled with I^{125} using the lactoperoxidase method. This allowed the development of radioreceptor assays using hepatic and mammary tissues of pregnant rabbits. These assays were used to compare binding properties to hepatic and mammary receptors of highly purified Bovine Placental Somatomotropin and the native hormone present in cotyledons. Normal levels of this hormone in foetal and maternal cotyledons were also determined using these assays.