

## DOSAGE DE L'HORMONE THYRÉOSTIMULANTE HYPOPHYSAIRE OVINE A L'AIDE D'UN SYSTÈME RADIO-IMMUNOLOGIQUE BOVIN

EFFETS COMPARÉS DE LA THYRÉOÏDECTOMIE ET DE LA CASTRATION  
SUR LES TAUX DE TSH ET DE LH PLASMATIQUES CHEZ LES OVINS

P. FREYCHET\*, J. PELLETIER\*\* et G. ROSSELIN\* (1)

avec la collaboration technique de Nicole GRENIER, Christiane ROUEL et G. FOUILLEUL

*\*Groupe de Recherche de Diabétologie et d'Études radio-immunologiques  
des Hormones protéiques de l'Institut national de la Santé et de la Recherche médicale,  
Hôtel-Dieu, 75 - Paris V\**

*\*\*Station de recherches sur la Physiologie de la Reproduction,  
Centre de Recherches de Tours, 37-Nouzilly  
Institut national de la Recherche agronomique*

---

### SOMMAIRE

Un dosage radio-immunologique de l'hormone thyroïdostimulante Ovine (OTSH) a été mis au point, qui utilise un système Bovin comportant : pour l'iodation une TSH Bovine (BTSH) purifiée, un antisérum anti-BTSH, et le Standard International de TSH (origine Bovine) comme hormone étalon de référence.

La TSH Ovine se comporte de façon analogue à la TSH Bovine dans ce système. Une correspondance satisfaisante se dégage de la comparaison des estimations radio-immunologique et biologique du contenu en TSH (ou d'un contaminant TSH) dans diverses préparations hypophysaires Bovine et Ovines.

Des préparations purifiées d'hormones lutéinisante Ovine (OLH) et folliculo-stimulante Ovine (OFSH) réagissent dans le système <sup>125</sup>I BTSH--anti-BTSH, mais les effets inhibiteurs observés avec ces deux préparations ne sont pas parallèles à ceux obtenus avec les TSH Bovine et Ovine. Les caractères de l'inhibition observée et le fait qu'une suppression des interférences avec OLH et OFSH est réalisée lorsque 20 m $\mu$ g de OLH purifiée sont ajoutés au système, sont discutés en fonction des observations effectuées dans l'espèce Humaine à propos des réactions croisées entre la TSH, la LH, la FSH et la gonadotrophine chorionique (HCG).

La saturation du système <sup>125</sup>I BTSH--anti-BTSH par la LH Ovine, dans des conditions quantitatives définies, rend ce système spécifique vis-à-vis de la TSH Ovine. Les résultats du dosage de la TSH plasmatique Ovine (exprimés en  $\mu$ U du Standard International de TSH) sont les suivants (moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne) : 20,9  $\pm$  1,7  $\mu$  UI/ml chez 9 brebis témoins ; 21,7  $\pm$  2,5  $\mu$  UI/ml chez 6 béliers témoins ; 21,1  $\pm$  1,4  $\mu$  UI/ml dans ce groupe témoin de 15 animaux. La TSH n'a pas été détectable dans le plasma de 4 animaux hypophysectomisés.

L'élévation de la TSH plasmatique après thyroïdectomie, la réduction des valeurs plasmatiques sous l'effet de la L-Thyroxine administrée à 3 brebis thyroïdectomisées, sont analysées et comparées à l'absence de variations des concentrations plasmatiques de LH chez les mêmes animaux.

Les effets de la castration sur les concentrations plasmatiques respectives de LH et de TSH sont comparés chez 6 béliers.

(1) Les demandes de tirage à part doivent être adressées à J. PELLETIER.

Dans le but de doser l'hormone thyroestimulante hypophysaire ovine (OTSH) par la méthode radio-immunologique, et ne disposant pas de TSH Ovine hautement purifiée, nous avons utilisé un système Bovin : TSH Bovine marquée ( $^{131}\text{I}$  BTSH)-anticorps anti-BTSH. Cet article développe les points suivants :

1<sup>o</sup> caractères de la réaction croisée observée entre ce système radio-immunologique Bovin et la TSH Ovine ;

2<sup>o</sup> spécificité de ce système vis-à-vis de la TSH Ovine, par rapport aux autres hormones glycoprotéiniques hypophysaires Ovines. Ce problème a été abordé en comparant les effets exercés sur le système Bovin par diverses préparations hypophysaires purifiées Ovines et par des plasmas d'ovins dans une situation expérimentale susceptible de modifier la concentration plasmatique de la TSH (thyroïdectomie) ou celle de l'hormone lutéinisante LH (castration). Une interférence de la TSH Ovine dans des systèmes utilisés pour le dosage radio-immunologique de la LH Ovine a en effet été rapportée (BARON, TERTRIN et JUTISZ, 1967 ; PELLETIER, KANN, DOLAIS et ROSSELIN, 1968 a ; GESCHWIND et DEWEY, 1968.) Les taux de LH ont donc été déterminés, parallèlement à ceux de TSH, dans les plasmas étudiés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. — Technique du dosage radio-immunologique de la TSH

1<sup>o</sup> *Préparation des antisérums.* — Les antisérums ont été préparés chez des cobayes selon une technique précédemment décrite (FREYCHET, ROSSELIN, DROUET, ASSAN, DOLAIS, TCHOBROUTSKY et DÉROT, 1966). La TSH Bovine utilisée comme antigène est une préparation commerciale (Thyréotrope Choay, lot 64 P<sup>8</sup>, titrant environ 0,7 à 0,8 UI ou USP/mg).

2<sup>o</sup> *Radio-iodations.* — L'hormone utilisée pour les radio-iodations est une préparation (8-18-A) purifiée de TSH Bovine préparée par Y. FONTAINE, selon la méthode de CONDLIFFE, BATES et FRAPS (1959).

Les marquages à l'iode  $^{131}\text{I}$  (I S<sub>3</sub> Saclay) ont été effectués en collaboration avec J. DROUET, selon la méthode décrite pour l'hormone de croissance humaine (HUNTER et GREENWOOD, 1962). Le rendement de l'iodation, déterminé par chromatographie électrophorèse sur papier, se situe entre 75 et 95 p. 100 selon les marquages. L'activité spécifique des préparations obtenues est comprise entre 100 et 150 microcuries par  $\mu\text{g}$ . Les préparations de  $^{131}\text{I}$  BTSH ont été purifiées par chromatographie sur poudre de cellulose, selon une modification de la technique de YALOW et BERSON (1960) utilisée initialement pour la purification de l'insuline marquée. Les fractions radio-iodées les plus immunoréactives sont liées à environ 90 p. 100 par un antisérum en excès.

3<sup>o</sup> *Conditions d'incubation.* — Un tampon véronal 0,025 M, pH 8,6, contenant 0,5 p. 100 d'albumine humaine est utilisé comme diluant de façon à réaliser un volume final d'incubation de 500  $\mu\text{l}$  par tube. Des quantités variables d'une préparation hormonale étalon (standard), ou d'échantillons à étudier (pour les plasmas, 10 à 50  $\mu\text{l}$ , soit des dilutions de 1 : 50 à 1 : 10), sont ensuite ajoutées ; puis 50  $\mu\text{l}$  d'un antisérum anti-BTSH préalablement dilué au 1 : 12 500. Une quantité traceuse d'hormone iodée, représentant 0,05 à 0,1  $\mu\text{g}$  par tube selon l'activité spécifique est introduite dans chaque tube. L'addition de l'hormone iodée est habituellement effectuée 24 à 36 h après incubation préalable des préparations hormonales ou des plasmas avec l'antisérum. L'incubation est ensuite poursuivie à + 4°C pendant 5 jours.

4<sup>o</sup> *Séparation de l'hormone liée à l'anticorps et de l'hormone libre.* — Elle est réalisée par immunoprécipitation du complexe hormone-anticorps anti-hormone en utilisant un sérum de lapin antiglobulines de cobaye (ROSSELIN et DOLAIS, 1968). Le précipité est lavé, puis compté dans un spectromètre auto-gamma.

## B. — Dosage de la LH plasmatique

La LH plasmatique a été dosée par méthode radio-immunologique selon la technique récemment décrite (PELLETIER, KANN, DOLAIS et ROSSELIN, 1968 a) en utilisant un système LH Ovine marquée-anticorps anti LH Ovine.

## C. — Préparations hypophysaires étudiées

<sup>10</sup> Le standard international de TSH (MUSSETT et PERRY, 1955), d'origine bovine, obtenu par l'intermédiaire du *National Institute for Medical Research* (Londres), a été utilisé comme préparation de référence.

Les préparations hormonales étudiées dans le système <sup>125</sup>I BTSH—anti-BTSH, sont les suivantes :

— la TSH Bovine 8-18-A possède une activité biologique de 14,2 UI/mg en août 1965 (méthode de QUERIDO modifiée par FONTAINE, 1955) ;

— La TSH Bovine NIH-B<sub>4</sub> possède une activité biologique moyenne de 2,12 UI/mg ;

— la TSH Ovine NIH-S<sub>6</sub> possède une activité biologique moyenne de 1,44 UI/mg ;

— une préparation d'hormone de croissance ovine (OGH), NIH/S<sub>6</sub> (1 U. USP GH/mg), présente une contamination TSH estimée biologiquement à 0,013 UI/mg ;

— la Prolactine Ovine (NIH-S<sub>6</sub>, activité biologique moyenne de 24,8 U/mg), présente une activité thyroestimulante inférieure à 0,000 3 UI/mg ; les activités TSH des préparations NIH indiquées dans les spécifications accompagnant l'envoi de ces préparations, ont été déterminées selon la méthode de LAMBERG (1953) ;

TABLEAU I

Origine	Préparation	D. R. I.	D. B.
TSH Bovine	8-18-A	10	14,2
TSH Bovine	NIH-B <sub>4</sub>	1,50	2,12
TSH Ovine	NIH-S <sub>6</sub>	0,70	1,44
LH ovine	M <sub>1</sub>	Effet parallèle à celui de BTSH seulement après saturation (1) avec équivalence de :	n. d.
			0,006
FSH ovine	H-De-58	Effet non parallèle à celui de BTSH	n. d.
GH ovine	NIH-S <sub>6</sub>	0,007	0,013
Prolactine ovine	NIH-S <sub>6</sub>	< 0,001	< 0,0003

Activité TSH (UI/mg) déterminée dans diverses préparations hormonales hypophysaires par dosage radio-immunologique (D. R. I.) et par dosage biologique (D. B., valeurs communiquées par les laboratoires respectifs d'où proviennent les préparations étudiées).

n. d. = non déterminé ou non communiqué.

(1) Voir le texte pour la discussion.

— une préparation de LH Ovine (LH-M<sub>1</sub>) hautement purifiée par JUTISZ et COURTE (1968) possédant une activité de 1,8 Unité de LH-NIH-S<sub>1</sub>/mg)

— une préparation (H De 58), purifiée par M. JUTISZ, d'hormone folliculo-stimulante (FSH) Ovine (5 Unités de FSH NIH-S<sub>1</sub>/mg)

— l'extrait hypophysaire brut étudié a été obtenu à partir d'une poudre lyophilisée provenant d'hypophyses ovines.

D. — *Expérimentation animale*

Des animaux de race *Ile-de-France*, âgés de 12 à 15 mois, ont subi des prélèvements de sang à la suite de l'ablation chirurgicale de la thyroïde, ou des gonades. A titre de contrôle, 4 hypophysectomies ont été effectuées. Dans tous les cas, l'anesthésie a été faite au pentothal avec entretien par l'ercylène ou le fluothane. Neuf brebis et six béliers intacts ont servi de contrôles.

Des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine jugulaire et recueillis sur héparine ; les plasmas aussitôt séparés par centrifugation réfrigérée ont été conservés congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au dosage.

1. *Thyroidectomie*. — Trois brebis ont subi une thyroidectomie totale. Celle-ci a été vérifiée complète 4 à 6 semaines après l'intervention selon la technique décrite par THERIEZ (1962), utilisant l'iode radioactif. Six semaines après la thyroidectomie, les 3 brebis ont reçu une injection intraveineuse de 2,5 mg de L-Thyroxine (L-T<sub>4</sub>) par jour pendant 15 jours consécutifs. L'une des brebis a subi des prélèvements rapprochés immédiatement après l'intervention. Les deux autres ont subi des prélèvements 10, 20 et 30 jours après la thyroidectomie. Des prélèvements ont été effectués chez les trois brebis au cours du traitement par la T<sub>4</sub> et après l'interruption de celui-ci.

2. *Castration*. — Six béliers ont subi des prélèvements quotidiens, le premier précédant immédiatement l'intervention, les autres effectués du 1<sup>er</sup> au 7<sup>e</sup> jour suivant l'intervention.

3. *Hypophysectomie*. — Deux brebis et 2 béliers ont subi l'ablation de l'hypophyse par voie parapharyngée (intervention effectuée par M. COUROR selon la technique de R. DENAMUR et J. MARTINET, communication personnelle.) Les plasmas ont été prélevés 15 jours à 1 mois plus tard. Le contrôle de l'hypophysectomie a été effectué par sections sériées de la selle turcique, sauf chez une brebis où a été réalisée une vérification macroscopique.

## RÉSULTATS

A. — *Effets comparés des préparations de TSH Bovine et Ovine dans le système <sup>131</sup>I BTSH—anti-BTSH (fig. 1)*

La préparation de TSH Ovine (NIH-S<sub>8</sub>) inhibe aussi complètement que le Standard International de TSH (origine Bovine) la liaison de la TSH Bovine radio-iodée à un antisérum anti TSH Bovine. La représentation graphique des effets inhibiteurs respectifs exercés par diverses concentrations de ces deux préparations montre que celles-ci se comportent de façon semblable vis-à-vis de l'antisérum utilisé dans le système radio-immunologique de dosage.

Il en est de même pour : a) un extrait hypophysaire ovin ; b) un plasma de brebis thyroidectomisée.

Un plasma de brebis hypophysectomisée n'a pas exercé d'effet inhibiteur appréciable.

B. — *Effets de préparations hypophysaires purifiées Ovines dans le système <sup>131</sup>I BTSH—anti-BTSH (fig. 2)*

1. *La préparation de LH Ovine M<sub>1</sub>* exerce un effet inhibiteur net sur la liaison <sup>131</sup>I BTSH—anti-BTSH. L'inhibition, rapportée à celle exercée par la BTSH, n'est pas une fonction linéaire de la quantité de OLH introduite dans le système. Il peut être vu sur la figure 2 que, pour cet antisérum et à la dilution utilisée, il existe une zone (à partir de 0,5-1 µg/ml d'incubation) dans laquelle la OLH inhibe de façon compétitive, la liaison <sup>131</sup>I BTSH—anti-BTSH. A partir de 10 µg de OLH par ml, il apparaît une zone de saturation relative dans laquelle des concentrations croissantes de OLH sont relativement inefficaces, alors que des concentrations faibles de BTSH sont

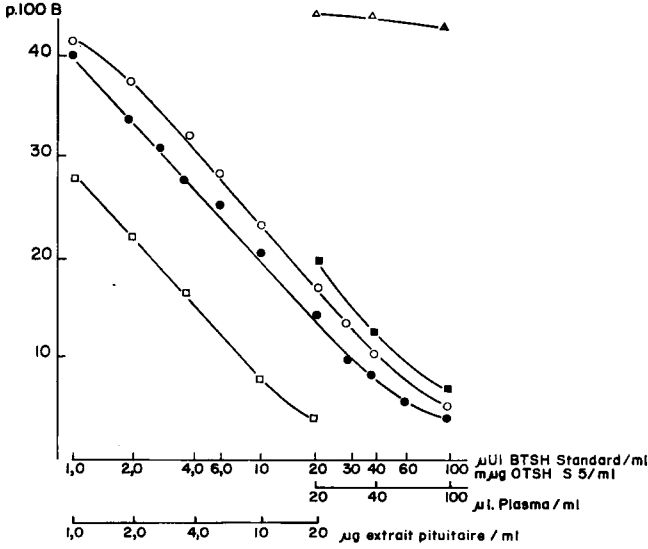


FIG. 1. — Effets comparés de la TSH Bovine standard, d'une préparation de TSH Ovine, d'un extrait hypophysaire Ovin et de deux plasmas de brebis (l'une thyroïdectomisée, l'autre hypophysectomisée) sur la liaison de la <sup>131</sup>I BTSH à l'antisérum anti-BTSH (p. 100 B : pourcentage de <sup>131</sup>I BTSH liée à l'anticorps)

- Extrait pituitaire ovin
- BTSH standard
- OTSH NIH S 5
- Plasma brebis thyroïdectomisée
- △ Plasma brebis hypophysectomisée

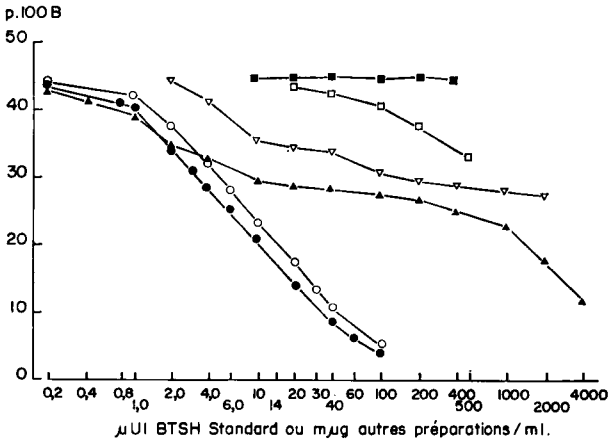


FIG. 2. — Effets de différentes préparations hypophysaires Bovine et Ovines sur la liaison de la <sup>131</sup>I BTSH à l'antisérum anti-BTSH (p. 100 B : pourcentage de <sup>131</sup>I BTSH liée à l'anticorps)

- BTSH standard
- OTSH NIH S 5
- ▲ OLH M<sub>1</sub>
- ▽ OFSH H de S 8
- OGH NIH S 5
- Prolactine NIH S 6

suffisantes, pour inhiber la liaison à l'anticorps de la BTSH radio-iodée. A partir de 20  $\mu\text{g}$  de OLH par ml d'incubation, cet effet est compatible avec la présence d'un contaminant TSH infime (de l'ordre de 0,006 UI/mg) dans cette préparation de OLH.

2. La *préparation de FSH Ovine* (H-De-58) est moins réactive que la préparation de OLH  $M_1$  dans ce système. Cependant, on observe également, avec cette préparation, une inhibition de caractère limité lorsque des quantités croissantes sont ajoutées.

3. La *préparation de GH Ovine* (NIH- $S_8$ ) n'est que faiblement réactive. L'effet inhibiteur observé avec les plus fortes concentrations étudiées de cette préparation est grossièrement parallèle à celui observé avec les préparations de TSH Ovine et Bovine.

4. La *préparation de Prolactine Ovine* (NIH- $S_9$ ) n'exerce pas d'effet inhibiteur appréciable jusqu'à une concentration de 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Une détermination radio-immunologique du contenu en TSH peut être effectuée pour les préparations hypophysaires qui exercent, dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH étudié, un effet inhibiteur parallèle à celui obtenu avec le Standard International de TSH, préparation d'origine Bovine servant de référence (tabl. 1).

### C. — Courbe de référence

La courbe de référence obtenue lorsque des concentrations croissantes de TSH Standard sont introduites dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH est représentée sur la figure 3.

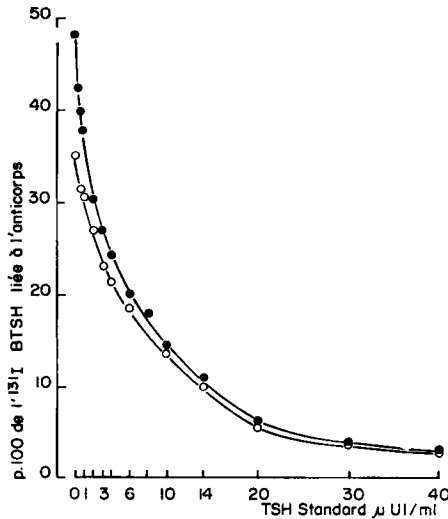


FIG. 3. — Courbes de référence obtenues lorsque des quantités croissantes de TSH standard sont introduites dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—antisérum anti BTSH

- Résultats obtenus en l'absence de OLH ajoutée au système.
- Résultats obtenus lorsque 20  $\mu\text{g}$  de OLH  $M_1$  sont ajoutés, par ml d'incubation, dans chaque tube = système saturé utilisé pour le dosage de la TSH Ovine plasmatique).

L'adjonction de LH Ovine  $M_1$  dans chaque tube d'incubation, à la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$ , permet d'obtenir une courbe de référence pour le dosage de la TSH Ovine plasmatique, ne prenant pas en compte la LH Ovine susceptible d'être présente dans les plasmas étudiés. Ainsi, lorsque le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH est saturé par la LH Ovine, les valeurs plasmatiques de TSH observées chez des béliers castrés apparaissent notablement inférieures à celles obtenues avec ces mêmes plasmas dans le système non saturé par la LH Ovine (fig. 5).

Ce système de dosage permet de détecter au minimum, par millilitre de milieu d'incubation, une quantité de TSH Standard égale à 0,8  $\mu$  UI.

#### D. — Dosage de la TSH plasmatique Ovine dans le système radio-immunologique Bovin Comparaison avec les taux plasmatiques de LH

Les valeurs de TSH rapportées sont exprimées en micro-Unités Internationales de TSH bovine par ml de plasma. Les valeurs de LH sont exprimées en  $\mu\text{g}$  de LH  $M_1$  par ml de plasma.

1. *Animaux témoins.* — Les valeurs moyennes ( $\pm$  erreur type de la moyenne) obtenues chez 9 brebis et 6 béliers sont respectivement de :  $20,9 \pm 1,7 \mu\text{UI/ml}$  ( $n : 9$ , valeurs extrêmes 16 et 30), et de :  $21,7 \pm 2,5 \mu\text{UI/ml}$  ( $n : 6$ , valeurs extrêmes 15 et 31). La moyenne de ce groupe de 15 animaux est de :  $21,1 \pm 1,4 \mu\text{UI/ml}$ .

Les valeurs de LH plasmatique sont dans ce groupe de :  $3,7 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$  (valeurs extrêmes : 1,2 et 4,6).

Quatre plasmas d'animaux hypophysectomisés n'ont pas exercé d'effet inhibiteur détectable (inférieur à 8  $\mu\text{UI/ml}$ ) dans le système de dosage. La LH n'a pu être détectée dans ces 4 plasmas.

2. *Influence de la thyroïdectomie* (fig. 4). — Les plasmas provenant de 3 brebis thyroïdectomisées ont exercé des effets très marqués dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH.

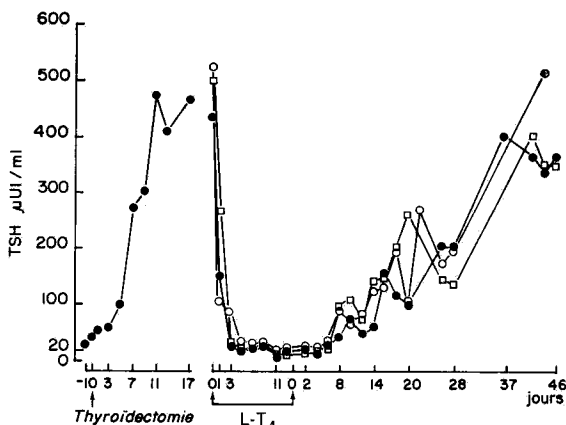


FIG. 4. — Concentrations plasmatiques de TSH. 1° chez une brebis après thyroïdectomie ; 2° chez 3 brebis thyroïdectomisées soumises à un traitement par la  $L-T_4$ , pendant ce traitement, et après son interruption

- Brebis n° 324
- Brebis n° 070
- Brebis n° 218

TABLEAU 2

	Après thyroïdectomie					Traitement par L-T <sub>4</sub>		Arrêt L-T <sub>4</sub>
	0	10	20	30	45 <sup>+++</sup>	0	14	42
Jours.....	0	10	20	30	45 <sup>+++</sup>	0	14	42
TSH (μUI/ml).....	20,6 ± 3,8	377 ± 38 <sup>+++</sup>	533 ± 89 <sup>++</sup>	463 ± 45 <sup>+++</sup>	487 ± 25	425 ± 46	13 ± 2,5 <sup>***</sup>	425 ± 46
LH (mμg/ml).....	4,7 ± 0,5	3,3 ± 0,8	3,1 ± 0,5	3,3 ± 0,3	3,2 ± 0,5	4,4 ± 0,4	3,3 ± 0,5	4,4 ± 0,4

TSH et LH plasmatiques chez 3 brebis (moyennes ± erreur-type de la moyenne) après thyroïdectomie et traitement par la thyroxine.

+++ Différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) par rapport au temps 0 (avant thyroïdectomie).

++ Différence très hautement significative ( $p < 0,01$ ) par rapport au temps 0 (avant thyroïdectomie).

\*\*\* Différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) par rapport au temps 0 (avant traitement par L-T<sub>4</sub>).

Les valeurs observées à différents intervalles de temps après la thyroïdectomie sont présentées sur le tableau 2. Des prélèvements répétés effectués chez l'une des brebis montrent que la concentration plasmatique en TSH est environ 4 fois plus élevée que sa valeur basale dès le 5<sup>e</sup> jour après la thyroïdectomie. Les valeurs observées chez les 3 brebis, 3 à 6 semaines après la thyroïdectomie, représentent 20 à 25 fois les valeurs de base.

L'administration intraveineuse de 2,5 mg de L-T<sub>4</sub> a entraîné chez les 3 brebis thyroïdectomisées, une diminution spectaculaire et rapide de la TSH plasmatique (fig. 4 et tabl. 2). Dès le lendemain de la première injection, des diminutions de 65 p. 100, 47 p. 100 et 80 p. 100 par rapport aux valeurs pré-thérapeutiques, ont été respectivement obtenues chez les brebis n° 324, 070 et 218. Le retour à des valeurs semblables à celles des animaux témoins est réalisé chez 2 des 3 brebis dès le 3<sup>e</sup> jour d'administration quotidienne de 2,5 mg de L-T<sub>4</sub> par voie veineuse.

L'arrêt de ce traitement est suivi d'une remontée des concentrations plasmatiques de TSH chez les 3 brebis thyroïdectomisées. Cependant, cette remontée apparaît sensiblement plus lente que l'élévation observée chez l'une d'elles après thyroïdectomie. Quatre semaines après la dernière injection de L-T<sub>4</sub>, les valeurs observées sont encore très notablement inférieures à ce qu'elles étaient avant le traitement. Elles ne deviennent relativement proches des valeurs pré-thérapeutiques que 5 semaines (brebis 324) et 6 semaines (brebis 070 et 218) environ après la dernière injection de L-T<sub>4</sub>.

Par contraste avec les variations observées pour la TSH plasmatique, ni la thyroïdectomie ni le traitement par la L-T<sub>4</sub> n'ont influé sur les taux plasmatiques de LH (tabl. 2).

3. *Influence de la castration* (fig. 5). — L'évolution des valeurs plasmatiques de la TSH après la castration diffère franchement de celle observée pour les concentrations plas-

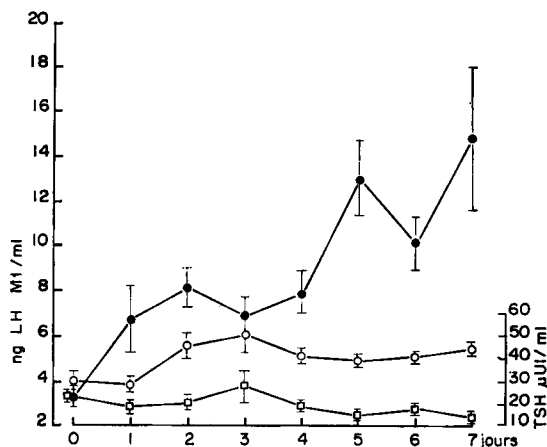


FIG. 5. — Évolution des concentrations plasmatiques (valeurs moyennes ± erreurs type des moyennes) de LH et de TSH chez 6 béliers après la castration (La castration a été effectuée au jour 0).

- Valeurs moyennes de LH
- Valeurs moyennes de TSH
- Valeurs moyennes de TSH en présence de 20 µµg de OLH M par ml d'incubation (système saturé)

matiques de LH chez les mêmes animaux. La LH plasmatique s'élève dès le premier jour post-opératoire avec une différence significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au taux initial. Dans le cas de la TSH, lorsque le système  $^{131}\text{I}$  BTSH-anti BTSH est saturé par la LH Ovine, les valeurs observées après la castration sont notablement inférieures à celles obtenues avec les mêmes plasmas dans le système non saturé.

## DISCUSSION

### 1. Réaction croisée entre TSH Bovine et TSH Ovine

Le système radio-immunologique  $^{131}\text{I}$ -BTSH—anti-BTSH utilisé est capable de doser la TSH Bovine : en effet, le comportement de la TSH Ovine contenue dans des préparations hypophysaires ou dans des plasmas est analogue à celui de la TSH Bovine dans ce système. Une concordance satisfaisante existe entre les estimations radio-immunologique et biologique de la TSH (ou d'un contaminant TSH) dans les différentes préparations hypophysaires Ovines et Bovine étudiées dans ce système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH.

Alors que la spécificité antigénique d'espèce de la TSH Humaine, appréciée par la méthode radio-immunologique, apparaît être relativement étroite (UTIGER, ODELL et CONDLIFFE, 1963 ; UTIGER, 1965 ; FREYCHET, DOLAIS et ROSSELIN, 1967 a ; ODELL, WILBER et UTIGER, 1967 ; FREYCHET, ROSSELIN et DOLAIS, 1968 ; FREYCHET, 1968), des réactions croisées ont pu être mises en évidence entre certaines TSH mammaliennes : bœuf et porc (FREYCHET, ROSSELIN, DROUET et *al.*, 1966) ; bœuf et rat (REICHLIN, SCHALCH, BOSHANS et PIERCE, 1966) ; bœuf, rat et souris (WILBER et UTIGER, 1967). Cependant, dans le cas des TSH Bovine et Porcine, la réaction croisée est apparue plus faible que la réaction directe avec les antisérums anti-TSH Bovine et anti TSH Porcine étudiés (FREYCHET, ROSSELIN, DROUET et *al.*, 1966). D'autre part, un système radio-immunologique Bovin ne s'est pas avéré suffisamment sensible vis-à-vis de la TSH de rat pour permettre sa détection dans les plasmas de rats normaux (REICHLIN, SCHALCH, BOSHANS et PIERCE, 1966). Le système Bovin utilisé ici présente une sensibilité suffisante vis-à-vis de la TSH Ovine pour permettre son dosage dans le plasma des animaux témoins.

### 2. Spécificité du système Bovin utilisé vis-à-vis de la TSH Ovine

L'analogie du comportement de la TSH Ovine vis-à-vis de celui de la TSH Bovine dans le système utilisé est une condition nécessaire mais non suffisante pour valider l'utilisation d'un tel système dans le but de doser la TSH Ovine.

Une interférence nette a été observée dans ce système avec deux préparations purifiées de LH et de FSH Ovines. L'aspect des phénomènes inhibiteurs observés avec ces deux préparations n'est pas en faveur d'une contamination TSH, car il n'est pas parallèle à celui exercé par des préparations de TSH Ovine dans le même système. En ce qui concerne la LH Ovine  $M_1$ , un effet inhibiteur compatible avec la présence d'un contaminant TSH dans cette préparation ne se manifeste que lorsque des quantités importantes sont utilisées.

Le fait que la même quantité de OLH ne déplace que 6 à 8 p. 100 de la  $^{131}\text{I}$  BTSH lorsque la liaison de celle-ci à l'antisérum est réalisée dans des conditions quantitatives d'excès d'anticorps, et 30 à 35 p. 100 de la même  $^{131}\text{I}$  BTSH lorsque l'antisérum est moins concentré, n'est pas en faveur d'une interférence qui ne serait due qu'à une contamination de  $^{131}\text{I}$  BTSH par  $^{131}\text{I}$  BLH.

Le caractère de l'inhibition réalisée par la LH Ovine  $M_1$  dans le système  $^{131}\text{I}$  BSTH—anti-BSTH, présente une certaine analogie avec les phénomènes observés lorsque des hormones glycoprotéiniques hypophysaires ou chorionique humaines sont introduites dans des systèmes radio-immunologiques de dosage de la TSH humaine (UTIGER, 1965 ; ODELL, WILBER et UTIGER, 1967 ; FRECHET, DOLAIS et ROSSELIN 1967 *b* ; FREYCHET, ROSSELIN et DOLAIS, 1968 ; ODELL, REICHERT et BATES, 1968 ; ROSSELIN, DOLAIS et FREYCHET, 1969 ou dans le dosage de la FSH humaine (ROSSELIN et DOLAIS 1967 *a* et *b*),

Nous avons vérifié que, lorsque le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH comportait 20  $\mu\text{g}$  de LH Ovine  $M_1$ /ml d'incubation, l'introduction de quantités croissantes de LH et de FSH Ovines dans le système ainsi traité ne provoquait plus d'effet inhibiteur supplémentaire appréciable (sauf s'il existe une contamination par TSH comme cela paraît être le cas, de façon infime, pour la LH  $M_1$ ). D'autre part, la comparaison des résultats quantitatifs obtenus avec les plasmas d'animaux témoins et de béliers castrés, selon que le système est traité ou non par la LH Ovine, autorise à penser que le système traité par la LH devient, dans les conditions utilisées, spécifique de la TSH. Les caractères de l'interférence observée avec la LH Ovine dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH nécessite d'utiliser ce système saturé par la LH Ovine pour doser les plasmas des animaux témoins et ceux susceptibles de contenir des quantités importantes de LH endogène, comme c'est le cas chez le bélier castré et la brebis au cours de l'œstrus (PELLETIER, KANN, DOLAIS et ROSSELIN, 1968 *b* ; GESCHWIND et DEWEY, 1968 ; NISWENDER, REICHERT, MIDGLEY et NALBANDOV, 1969).

### 3. Concentrations plasmatiques de la TSH chez des animaux témoins

Les valeurs observées chez 15 animaux témoins sont comprises entre 15 et 31  $\mu\text{UI/ml}$ . Rapportées à l'activité immunologique de la préparation purifiée 8-18-A de TSH Bovine, ces valeurs seraient comprises entre 1,5 et 3,1  $\mu\text{g/ml}$ . Des valeurs du même ordre de grandeur ont été rapportées en ce qui concerne la TSH plasmatique humaine, lorsque ces valeurs se réfèrent à l'effet immunologique d'une préparation purifiée de TSH humaine (ODELL, WILBER et UTIGER, 1967).

### 4. Influence de la thyroïdectomie sur les concentrations plasmatiques de TSH et de LH

La thyroïdectomie a été suivie d'une élévation franche et rapide des taux de TSH chez les 3 brebis étudiées. Une valeur relativement proche de celle obtenue un mois après la thyroïdectomie peut être observée dès le 10<sup>e</sup> jour suivant l'intervention.

La rapidité avec laquelle la concentration de la TSH endogène décroît au cours de l'administration intraveineuse de  $L-T_4$  aux brebis thyroïdectomisées, s'accorde avec les observations effectuées, dans des conditions expérimentales ou physiopathologiques semblables, chez des rats (WILBER et UTIGER, 1967) et chez l'homme (ODELL, WILBER et PAUL, 1965).

L'élévation relativement lente (par rapport à celle constatée après thyroïdectomie) observée après l'arrêt de la  $T_4$  chez les 3 brebis étudiées, peut être attribuée à l'importance de la dose de Thyroxine administrée et à la durée d'action de la  $T_4$ .

A la différence des variations observées pour la TSH plasmatique, les taux de LH sont restés pratiquement constants au cours des différentes phases de cette expérimentation.

### 5. Influence de la castration

Après la castration, les évolutions respectives des concentrations plasmatiques de LH et de TSH sont nettement différentes. Cependant, l'élévation de la LH plasmatique endogène apparaît interférer dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH lorsque celui-ci n'est pas saturé par la LH Ovine.

*En conclusion*, la TSH Ovine et la TSH Bovine se comportent de façon analogue dans le système  $^{131}\text{I}$  BTSH—anti-BTSH utilisé. Des préparations purifiées de LH et de FSH Ovines interfèrent dans ce système radio-immunologique Bovin. Le caractère de ces interférences est quantitativement limité mais il apparaît susceptible de donner des valeurs plasmatiques de TSH faussement élevées, même pour les plasmas dont le contenu en LH reste situé dans les limites physiologiques. L'introduction d'une quantité déterminée de LH ovine dans ce système permet, dans des conditions quantitatives définies, de le rendre spécifique vis-à-vis de la TSH ovine.

*Reçu pour publication en juillet 1969.*

## REMERCIEMENTS

Nous remercions : 1) pour leurs dons généreux en hormones purifiées, le Dr Y. FONTAINE (TSH bovine) et le Dr JUTISZ (LH et FSH Ovines) ; 2) La Section « Endocrinology Study » pour les différentes préparations hormonales hypophysaires ovines et bovines obtenues par l'intermédiaire du « Pituitary Hormone Distribution Program » (National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda) ; 3) le « National Institute for Medical Research » (Mill Hill, London) pour le standard international de TSH.

Nous remercions M<sup>me</sup> D. HENRY pour la préparation du manuscrit ; M<sup>lle</sup> A. PLANTEC et M<sup>me</sup> N. TRAMASAYGUES pour l'exécution des graphiques.

## SUMMARY

### RADIOIMMUNOASSAY OF OVINE THYROTROPIN (OTSH) USING A BOVINE TSH (BTSH) RADIOIMMUNOASSAY SYSTEM. COMPARATIVE EFFECTS OF THYROIDECTOMY AND CASTRATION UPON OVINE PLASMA TSH AND LH

A radioimmunoassay for OTSH has been developed which utilizes a Bovine system : purified BTSH for iodination, anti BTSH serum and the International standard for TSH (from Bovine origin) as a standard in immunoassay.

The immunological behavior of OTSH was similar to that of BTSH in this  $^{131}\text{I}$  BTSH-anti BTSH system (fig. 1). A satisfying agreement was observed between immunoassay and bioassay estimates of the TSH content (or contaminant) in various pituitary preparations from Bovine and Ovine origins (table 1).

Ovine Luteinizing Hormone (OLH) and, to a lesser extent, Folliculo-Stimulating Hormone (FSH) purified preparations reacted in the  $^{125}\text{I}$  BTSH-anti BTSH system (fig. 2). But the dose response was clearly different from that produced either by Bovine or by Ovine TSH. The system was sensitive to relatively small amounts of purified OLH (in the range 1-10  $\mu\text{g}$  per ml of incubation mixture) but OLH and FSH inhibiting effects did not parallel those of Bovine and Ovine TSH. From 10  $\mu\text{g}$  of OLH per ml, there was an area of relative saturation in which increasing amounts of OLH did not result in further inhibition of  $^{125}\text{I}$  BTSH-anti BTSH binding. Over 20  $\mu\text{g}$  of OLH added per ml, the pattern of inhibition was different and consistent with the presence of a TSH contaminant in the OLH preparation.

After addition of 20  $\mu\text{g}$  of purified OLH per ml, Ovine Gonadotropins no longer inhibited the  $^{125}\text{I}$  BTSH-anti BTSH binding in the quantitative conditions used in this study.

The level of sensitivity of the assay was 0.8  $\mu$  I.U. (International Standard for TSH Units) per ml of incubation mixture, in the OLH saturated system (fig. 3).

Plasma TSH values (mean  $\pm$  sem) were as follows : 20.9  $\pm$  1.7  $\mu$  I.U./ml in 9 normal ewes (range 16-30) ; 21.7  $\pm$  2.5  $\mu$  I.U. ml in 6 normal rams (range 15-31) ; 21.1  $\pm$  1.4  $\mu$  I.U./ml in these 15 animals as a control group (range 15-31). Plasma LH was 3.7  $\pm$  0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $n = 15$  ; range 1.2-4.6) in this group. Plasma TSH was undetectable ( $< 8 \mu$  I.U./ml) in 4 hypophysectomized animals.

Thyroidectomy resulted in a rapid increase in plasma TSH of 3 ewes (tabl. 2 and fig. 4). A 25-fold rise in plasma TSH was observed 3 weeks after thyroidectomy. Following intravenous administration of L-Thyroxine (L-T<sub>4</sub>, 2.5 mg per day) to thyroidectomized animals, plasma TSH fell to normal values within 3-5 days. Following discontinuation of L-T<sub>4</sub> therapy, plasma TSH levels became elevated in 8-10 days, but return to high values similar to those observed before T<sub>4</sub> treatment was hardly achieved 5-6 weeks after withdrawal of L-T<sub>4</sub>. Plasma LH values remained at normal level during the course of these experiments.

While castration resulted in a rapid increase in plasma LH over a 7-day post-operative period, plasma TSH variations did not correlate those of LH (fig. 5). However, a slight increase was observed, which was significant on the 7th day after castration, when the untreated (without OLH) radioimmunoassay system was used. Utilizing the OLH saturated system for plasma samples from castrates gave values which were significantly lower than those obtained with the untreated system.

The conclusions of these results are as follows :

1. the similar behavior of Ovine and Bovine TSH in the  $^{125}\text{I}$  BTSH-anti BTSH system allows immunoassay of Ovine TSH with this system which is sensitive enough to measure plasma TSH in normal ewes and rams ;
2. the pattern of cross reactions observed in this system with purified Ovine LH and FSH as well as effects obtained with plasma from castrated rams, show that Ovine Gonadotropins interfere *per se* in the system. However, it is possible to obliterate this cross reactivity by adding Ovine LH. This saturation with Ovine LH makes Bovine TSH system suitable for specific immunoassay of Ovine TSH.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARON G., TERTRIN C., JUTISZ M., 1967. Dosage radio-immunologique de l'hormone lutéinisante (LH) de mouton. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, 2061.
- CONDLIFFE P. G., BATES R. W., FRAPS R. M., 1959. Fractionation of bovine Thyrotropin and luteinizing hormone on cellulose ion exchange columns. *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 430-438.
- FONTAINE Y.-A., 1955. Contribution à l'étude du dosage de l'hormone thyroïdienne dans l'hypophyse de divers vertébrés au moyen de l'iode radioactif. *Arch. Sci. Physiol.*, **9**, 183-207.
- FREYCHET P., ROSSELIN G., DROUET J., ASSAN R., DOLAIS J., TCHOBROUTSKY G., DEROT M., 1966. Étude radio-immunologique de la Thyroestimuline Bovine (BTSH). Résultats obtenus à l'aide de BTSH radio-iodée et d'antisérums anti-TSH Bovine et anti-TSH Porcine. *Path. Biol.*, **14**, 340-347.
- FREYCHET P., DOLAIS J., ROSSELIN G., 1967 a. TSH plasmatique. Revue de la littérature. Résultats personnels. In *Journées Ann. Diabétologie Hôtel-Dieu* 1967, 1 vol., Flammarion Méd. Éd. p. 209-227.
- FREYCHET P., DOLAIS J., ROSSELIN G., 1967 b. Immunologic studies with radio-iodinated bovine thyrotropin, antibovine and antiporcine thyrotropin sera, and human pituitary glycoprotein hormones. *Symposium Int. Pharmac. Polypeptides Horm.* Milan sept., abstract p. 38.
- FREYCHET P., ROSSELIN G., DOLAIS J., 1968. Radioimmunological study of cross reactions presented by the human thyrotropin, in « *Protein and Polypeptide Hormones* » part. 2, M. Margouliès Ed. p. 348-350 Excerpta Medica Foundation, International Congress series n° 161.

- FREYCHET P., 1968. Study of immunological cross-reactions and specificity of human thyrotropin (HTSH) by means of radioimmunoassay. Third Int. Congress Endocr. *Excerpta Med. Found. Int. Congr. series n° 157*, abstract p. 13.
- GESCHWIND I. I., DEWEY R., 1968. Dynamics of luteinizing Hormone (LH) secretion in the cycling Eve : A radioimmunoassay study. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 451-455.
- HUNTER W. M., GREENWOOD F. G., 1962. Preparation of iodine 131 labelled human Growth Hormone of high specific activity. *Nature*, **104**, 495-496.
- JUTISZ M., COURTE C., 1968. Hormone lutéinisante (LH) de mouton. Étude physico-chimique et biologique. *Gen. Comp. Endocr.*, **11**, 562-574.
- LAMBERG B. A., 1953. Radioactive phosphorus as indicator in chick assay of thyrotropic hormone. *Acta Med. Scand.*, Suppl. 279.
- MUSSETT M. V., PERRY W. L. M., 1955. The International Standard for Thyrotrophin. *Bull. Org. Mond. Santé*, **13**, 917-929.
- NISWENDER G. D., REICHERT L. E., MIDGLEY A. R., NALBANDOV A. V., 1969. Radioimmunoassay for Bovine and Ovine Luteinizing Hormone. *Endocrinology*, **84**, 1166-1173.
- ODELL W. D., WILBER J. F., PAUL W. E., 1965. Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human serum. *J. Clin. Endocr.*, **25**, 1179-1188.
- ODELL W. D., WILBER J. F., UTIGER R. D., 1967. Studies of Thyrotropin physiology by means of radioimmunoassay. *Recent Prog. Horm. Res.*, **23**, 47-85.
- ODELL W. D., REICHERT L. E., BATES R. W., 1968. Pitfalls in the radioimmunoassay of carbohydrate containing Polypeptide Hormones. In « *Protein and Polypeptide Hormones* » part. 1., M. Margoulies Ed. p. 124-128. Excerpta Medica Foundation, International Congress series n° 161.
- PELLETIER J., KANN G., DOLAIS J., ROSSELIN G., 1968 a. Dosage radio-immunologique de l'hormone lutéinisante plasmatique chez le Mouton. Mise au point de la technique de dosage. *C.R. Acad. Sci.*, **268**, 2291-2294.
- PELLETIER J., KANN G., DOLAIS J., ROSSELIN G., 1968 b. Dosage radioimmunologique de l'hormone lutéinisante plasmatique chez le Mouton. Comparaison avec le dosage biologique de LH par la diminution de l'acide ascorbique ovarien, et exemple d'application aux mesures de la LH sanguine chez la Brebis. *C. R. Acad. Sci.*, **268**, 2352-2354.
- REICHLIN S., SCHALCH D. S., BOSHANS R. L., PIERCE J., 1966. In « *48th Meeting of the Endocrine Society* », Chicago, p. 90 (abstr.).
- ROSSELIN G., DOLAIS J., 1967 a. Dosage de l'hormone folliculo-stimulante Humaine (HFSH) par la méthode radio-immunologique. *Presse Méd.*, **75**, 2027-2030.
- ROSSELIN G., DOLAIS J., 1967 b. Immunologic specificity and cross reactions presented by human follicle stimulating hormone (HFSH). *Symposium Int. Pharmac. Polypeptides Horm.* Milan, sept., abstract p. 100.
- ROSSELIN G., DOLAIS J., 1968. Application de la méthode radio-immunologique au dosage de l'insuline humaine et au dosage de l'hormone folliculo-stimulante humaine (HFSH). *Ann. Biol. Clin.*, **79**, 763-791.
- ROSSELIN G., DOLAIS J., FREYCHET P., 1969. Étude de la spécificité des hormones gonadotrope et thyrotrope humaines par la méthode radio-immunologique. In : « La spécificité zoologique des hormones hypophysaires et de leurs activités ». *Colloque international du C. N. R. S.*, Paris 1968 (sous presse).
- THERIEZ C., 1962. *Action des hormones thyroïdiennes sur la croissance en longueur du brin de laine*. Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Paris.
- UTIGER R. D., ODELL W. D., CONDLIFFE P. G., 1963. Immunologic studies of purified Human and Bovine Thyrotropin. *Endocrinology*, **73**, 359-365.
- UTIGER R. D., 1965. Immunoassay of human plasma TSH. In « *Current Topics in Thyroid Research* ». Cassans et Andreoli Ed. p. 513-526 Academic Press.
- WILBER J. F., UTIGER R. D., 1967. Immunoassay studies of Thyrotropin in Rat pituitary glands and serum. *Endocrinology*, **81**, 145-151.
- YALOW R. S., BERSON S. A., 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, **30**, 1157-1175.