

Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Band: 34 (1978)

Artikel: Aspects radioimmunologiques des neuropeptides

Autor: Kerdelhue, Bernard

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-308142>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 17.11.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Laboratoire des Hormones polypeptidiques C.N.R.S., Gif-sur-Yvette

ASPECTS RADIOIMMUNOLOGIQUES DES NEUROPEPTIDES

BERNARD KERDELHUE

Résumé

Dans le domaine de la radioimmunologie des neuropeptides, des problèmes particuliers ont été rencontrés, au niveau de la formation de leur anticorps, de leur marquage par des isotopes radioactifs et de leur dosage.

La formation des anticorps a été généralement obtenue par injections, chez différentes espèces, des peptides adsorbés ou polymérisés (de différentes manières et au moyen de différents agents couplants) avec des molécules plus ou moins antigéniques. Néanmoins, des anticorps ont été aussi obtenus dans certains cas, après injection des peptides seuls, mais leurs titres sont, indépendamment de l'espèce utilisée pour l'immunisation, bien plus faibles que ceux généralement obtenus avec la méthode précédente.

Jusqu'à présent, des peptides marqués avec ^3H ou avec ^{125}I ont été utilisés comme traceurs pour développer des dosages radioimmunologiques. Les meilleures sensibilités sont généralement obtenues avec les traceurs ^{125}I ; les caractéristiques de spécificité sont souvent identiques dans les deux cas. Néanmoins, les modifications structurales apportées par l'introduction de l'iode peuvent conduire à des molécules présentant une adsorption non spécifique sur certains immunosérums.

Finalement, le dosage radioimmunologique des neuropeptides implique la considération, pour certains, de formes moléculaires multiples et, pour tous, d'activités peptidasiques plus ou moins spécifiques.

Ces trois rubriques seront discutées et illustrées à partir de résultats obtenus dans le cas du LHRH, du TRH et de la Substance P.

Summary

Immunological aspects of neurosecretory peptides are relevant to antibody generation, labelling of peptides for radioimmunoassays and in particular the metabolism of neuropeptides. Antibodies were generally produced by adsorption or polymerization (using different approaches and various coupling agents) of peptides with intrinsic antigenic molecules preceding their administration to recipient animals (rats, guinea pigs, rabbits and sheep) with adjuvants. Antibodies were also obtained by injecting peptides alone with or without adjuvants. However, independent of the recipient species, the highest specific or nonspecific antibody titers were obtained by the former method.

Up to now, only ^3H -peptides or ^{125}I -peptides or derivatives were used as tracers in RIAs. Highest sensitivities were generally obtained when using ^{125}I -peptides. However, ^{125}I -peptides may be adsorbed ("false titers") to some antiserum with sufficient specificity in terms of displacement by structural analogues of the peptide but with a loss of sensitivity.

Finally, large molecular forms, cross-reacting with the antibodies prepared with different methods and peptidasic activities must be taken into account.

These topics are presented with data on LHRH, TRH and substance P derived from our experiments and from those of other investigators.

La préparation et la caractérisation, à l'aide de la technique radioimmunologique, d'anticorps dirigés contre des hormones adénohypophysaires ou d'autres molécules dotées à la fois d'un poids moléculaire relativement élevé et d'une spécificité d'espèce n'ont jamais posé de problèmes majeurs, pas plus que la détermination radioimmunologique de ces hormones.

Par contre, il existe des aspects radioimmunologiques qui sont très particuliers aux neuropeptides pour des raisons structurales et métaboliques.

D'un point de vue structural, les neuropeptides identifiés jusqu'à ce jour sont généralement d'un faible poids moléculaire et ne possèdent pas de spécificité d'espèce à l'exception de ceux communs à l'hypophyse ou au tractus gastro-intestinal. En outre, la composition particulière de quelques-uns en amino-acides pose des problèmes au niveau de leur marquage par des isotopes radio-actifs et au niveau de la préparation de leurs anticorps. Ainsi, les résidus tyrosyl et histidyl sont absents de la substance P et de la somatostatine, les extrémités N-terminal sont bloquées dans le cas du TRH, du LHRH et de la neurotensine et les extrémités C-terminal sont aussi bloquées dans le cas du TRH, du LHRH et de la substance P.

D'un point de vue métabolique, tous les neuropeptides sont susceptibles d'être rapidement dégradés par des peptidases très largement distribuées dans les tissus nerveux mais aussi dans d'autres tissus. Ils semblent en outre posséder des formes moléculaires multiples.

Dans ce contexte, je traiterai successivement des aspects liés au "marquage" des neuropeptides, à la production et à la caractérisation de leurs anticorps et à leur dosage, en utilisant des résultats obtenus avec le LHRH, le TRH et la substance P.

1. Marquage des neuropeptides

Jusqu'à présent, seuls des neuropeptides "marqués" avec l'iode radioactif, le tritium ou le carbone 14 ont été préparés. Les plus fortes radioactivités spécifiques ont été évidemment obtenues par incorporation de l'iode 125 ou 131 mais, en dépit de leur faible radioactivité spécifique, les molécules marquées au C^{14} ou H^3 sont, pour des raisons qui seront exposées ci-dessous, très utiles.

La iodation des neuropeptides s'effectue classiquement sur les radicaux tyrosyl et histidyl, soit au moyen de la technique à la chloramine T proposée par GREENWOOD et al. (1963), soit au moyen d'une technique enzymatique (MARCHALONIS, 1969). Cependant, au contraire des molécules de faible poids moléculaire, ils subissent des modifications chimiques qui peuvent conduire à des pertes importantes de leurs activités biologiques et immunologiques, cette dernière étant généralement moins affectée.

La fig. 1 montre les différences qui existent dans le comportement sur gel de séphadex, entre le LH-RH et le ^{125}I -LH-RH obtenu par la technique à la chloramine T, même si la iodation est effectuée à 0° C, en présence de très faibles quantités de chloramine T et durant seulement quelques secondes. L'analyse par chromatographie électrophorèse montre que seul le dérivé mono-iodé est formé. Sa radioactivité spécifique est d'environ 1500 Ci/mM.

L'activité biologique de cette molécule marquée, recherchée dans un système in vitro (KERDELHUE et al., 1973), est de 70 % inférieure à celle de la molécule d'origine. Néanmoins, son activité immunologique ne semble pas être différente.

Des résultats similaires sont trouvés lorsque la iodation est effectuée par la méthode à la lactoperoxydase et lorsque la purification du milieu réactionnel est effectuée sur colonne de carboxyméthylcellulose (ARIMURA et al., 1973).

Des modifications des propriétés chimiques mais aussi des propriétés immunologiques ont été également notées dans le cas du TRH. BASSIRI et UTIGER (1972) ont trouvé par analyse sur gel de séphadex G-10, 3 différents pics de ^{125}I -TRH ayant en outre des différences dans leurs affinités de liaison vis-à-vis des IS anti TRH. Récemment, LING et al., (1976) ont montré que ces différents pics correspondaient à des dérivés mono-iodés et di-iodés contenant aussi du TRH non marqué.

Dans le cas des peptides ne contenant pas de résidus tyrosyl ou histidyl tels que la somato-

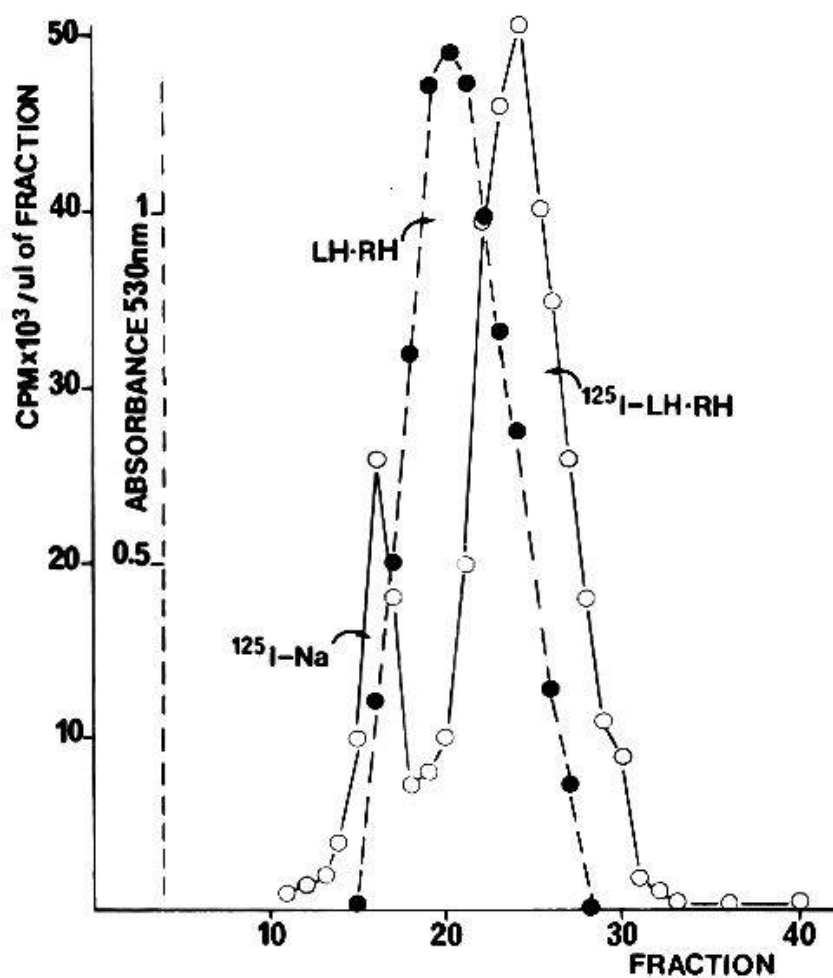


Fig. 1. Filtration sur une colonne de gel de Séphadex G75 (27 x 1,3 cm) du ^{125}I -LHRH (o—o) et du LHRH (●---●). Extrait de Kerdelhué et al., 1973.

statine ou la substance P, un résidu phénylalanyle, situé à l'intérieur de la séquence, a été remplacé par un résidu tyrosyle, mais l'introduction d'un tyrosyle à la partie N-terminale de la molécule a été aussi réalisée dans le cas de la somatostatine (ARIMURA et al., 1975). Ces dérivés ont généralement, déjà sous leur forme non marquée, une activité biologique réduite par rapport à la molécule initiale et l'on peut penser qu'il en est de même de leur activité immunologique puisque les immunosérums sont préparés à partir de la molécule initiale. Pour ces différentes raisons, l'utilisation de molécules "marquées" au C^{14} ou ^3H , parallèlement à celles de molécules iodées constitue, lorsque cela est possible, une sécurité dans le domaine de la radioimmunologie des petits peptides.

II. Préparation et caractéristiques des immunosérums anti-neuropeptides

Il n'est pas dans notre intention de faire ici un inventaire de tous les immunosérums (IS) anti-neuropeptides plus ou moins décrits jusqu'à ce jour. En fait, dans tous les cas, l'obtention

d'IS plus ou moins spécifiques et de titres plus ou moins importants a toujours été rapportée un certain temps après l'isolement du peptide considéré.

Dans ce contexte et en raison de leur antériorité, de nombreux travaux ont été effectués à partir du TRH et du LHRH et une certaine comparaison des caractéristiques des IS obtenus par différentes méthodes d'immunisations peut être effectuée.

A. Immunsérums obtenus après injection du peptide non modifié

Jusqu'à présent, seuls des IS anti-LHRH ont été obtenus de cette manière après injection, en présence d'adjuvant de Freund, du peptide adsorbé sur oxyde d'alumine (KERDELHUE et al., 1973) ou sur polyvinyl pyrrolidone (ARIMURA et al., 1973), respectivement chez le cobaye et le lapin. Néanmoins, les agents adsorbants des peptides et adjuvants de l'immunité ne jouent peut-être pas un rôle majeur puisque la formation d'anticorps a été aussi obtenue après injection du peptide seul, soit chez le lapin (DERMODY et al., 1973), soit chez l'homme (BROWN et al., 1977), après un traitement chronique par le LHRH par la voie sous-cutanée. Dans ce dernier cas, la formation d'anticorps peut être expliquée par une adsorption de l'haptène sur des substances de l'espèce réceptrice conduisant à la formation d'un immunogène. Finalement, dans l'un ou l'autre cas, l'augmentation des concentrations sériques en gonadotropine pourrait participer, par un mécanisme non encore élucidé, à la stimulation de la synthèse des anticorps en général (PIERPAOLI and MAESTRONI, 1977).

Les titres radioimmunologiques de tous les IS obtenus de cette manière sont généralement bas (de $1/500$ à $1/7000$) et la sensibilité des dosages radioimmunologiques développés avec ces IS est généralement faible. Finalement, aucune règle générale ne semble pouvoir être définie en ce qui concerne la spécificité de ces IS dont les réactions croisées vis-à-vis d'analogues structuraux du LHRH restent néanmoins très faibles (KERDELHUE et al., 1973b).

B. Immunsérums obtenus après injection du peptide modifié

Cette procédure qui consiste à coupler le peptide à une molécule porteuse dotée d'un pouvoir immunogène élevé est essentiellement utilisée pour tous les neuropeptides (Bibliographie dans KERDELHUE, 1977). La molécule porteuse est généralement l'albumine du sérum, les γ -globulines, l'haemocyanine et la thyroglobuline. Le couplage, au moyen du glutaraldéhyde ou de la carbodiimide s'effectue aux extrémités C et N-terminales des peptides lorsqu'elles sont libres ou rendues libres.

Des couplages plus particuliers, en une ou deux étapes, peuvent aussi être effectués sur les radicaux histidyl ou tyrosyl après leur carboximéthylation ou leur diazotation. Néanmoins, il faut conserver présent à l'esprit que le glutaraldéhyde et la carbodiimide permettent également un couplage plus "large" sur les radicaux tyrosyl, prolyl, arginyl et seryl, de même qu'ils permettent la polymérisation des molécules porteuses.

La comparaison des résultats obtenus par ces différentes méthodes est difficile. En effet, elles n'ont pas encore été toutes appliquées à un même neuropeptide. Dans le cas du LHRH et du TRH, où des comparaisons seraient théoriquement possibles, des séquences d'immunisation différentes ont été appliquées par les différents auteurs (Bibliographie dans KERDELHUE, 1977).

D'une manière générale, les titres radioimmunologiques obtenus sont compris entre $1/5000$ et $1/500000$, avec peu de variabilité pour un même immunogène utilisé dans les mêmes conditions chez une même espèce; dans le cas du TRH, du LHRH et de la substance P, ces titres sont fonction du nombre des immunisations et de la dose de l'immunogène. Les spécificités radioimmunologiques des IS obtenus à partir de différents immunogènes est cependant très variable.

La Fig. 2 montre les caractéristiques de spécificité et de sensibilité de 2 IS-LHRH avant des titres identiques, obtenus chez deux lapins différents après un même nombre d'injections de LHRH polymérisé avec des γ -globulines de cobaye à l'aide du glutaraldéhyde. Dans les deux cas, aucune réaction croisée n'est observée avec la forme acide du LHRH mais des réactions croisées très différentes existent avec un certain nombre d'analogues structuraux du LHRH. Elles sont très partielles pour l'IS n° 1 mais beaucoup plus importantes pour l'IS n° 2. Dans le cas de l'IS n° 1, la spécificité est voisine de celle généralement observée pour les IS obtenus sans couplage (KERDELHUE et al., 1973).

Certaines réactions croisées sont néanmoins liées à certains immunogènes. Ainsi, la désamidation du LHRH (JEFFCOATE et HOLLAND, 1975) et du TRH (VISSER et al., 1974), avant leur couplage, conduit à des IS qui reconnaissent aussi bien la forme libre que la forme amidée du peptide.

Ce point est important puisqu'il a été montré que la désamidation des neuropeptides est un processus physiologiquement important (bibliographie dans KERDELHUE, 1977).

Les caractéristiques d'un IS ne dépendent généralement pas du traceur utilisé mais certaines particularités peuvent être observées. Nous en donnerons ici 2 types d'exemple se rapportant au TRH d'une part et à la substance P d'autre part.

La Fig. 3 montre les courbes de titration à l'aide de deux traceurs différents de 2 IS anti-TRH obtenus au moyen de 2 immunogènes. Dans un cas le peptide a été couplé à la sérum

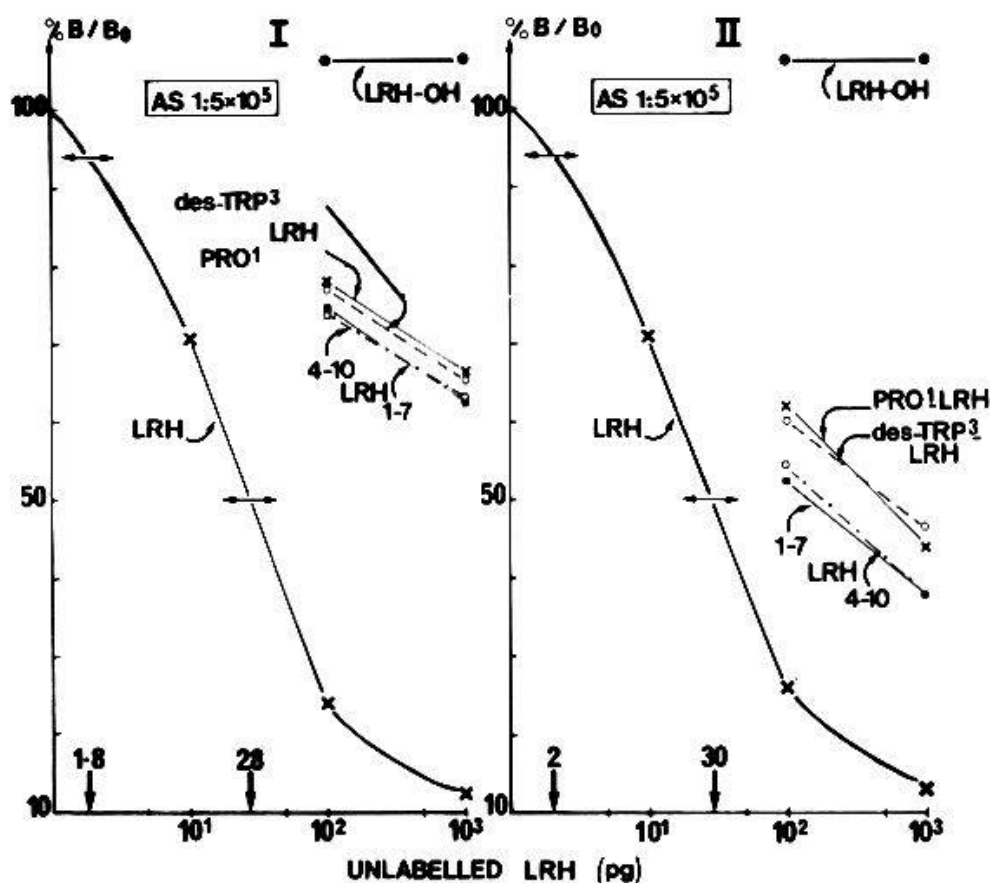


Fig. 2. Comparaison de la spécificité et de la sensibilité de 2 dosages radioimmunologiques développés à partir de 2 immunsérums obtenus chez 2 lapins différents à partir du même immunogène et d'un même protocole d'immunisation. Les flèches horizontales indiquent le point 50 % de déplacement du ^{125}I -LHRH lié aux immunsérums. La séparation du complexe antigène-anticorps est effectuée au moyen d'un 2ème anticorps.

albumine bovine (BSA) à l'aide du carbodiimide (CDI); dans l'autre, des γ -globulines de cobaye (GPYG) et du glutaraldéhyde (G) ont été respectivement utilisés. L'utilisation du ^{125}I -TRH donne des courbes de titration similaires pour les 2 IS; dans ce système, l'IS obtenu à partir du TRH-CDI-BSA a le titre le plus élevé. Par contre, des résultats très différents sont obtenus dans l'autre système; si le titre est voisin de celui trouvé avec le ^{125}I -TRH pour l'IS obtenu à partir du TRH-G-GPYG, il est pratiquement nul pour l'autre IS. Ces résultats indiquent qu'une adsorption du ^{125}I -TRH peut se produire sur certains IS-TRH. Ceci ne semble néanmoins pas affecter la spécificité intrinsèque vis-à-vis de certains analogues du TRH: elle est en effet identique pour les 2 IS vis-à-vis d'un certain nombre d'analogues structuraux du TRH. Par contre, la sensibilité est diminuée de manière importante: l'IS obtenu à partir du TRH-CDI-BSA comme immunogène a une mauvaise sensibilité, de l'ordre de 18 pg, avec l'un ou l'autre traceur. Elle est d'environ 2 pg avec l'IS ne présentant pas cette adsorption non spécifique.

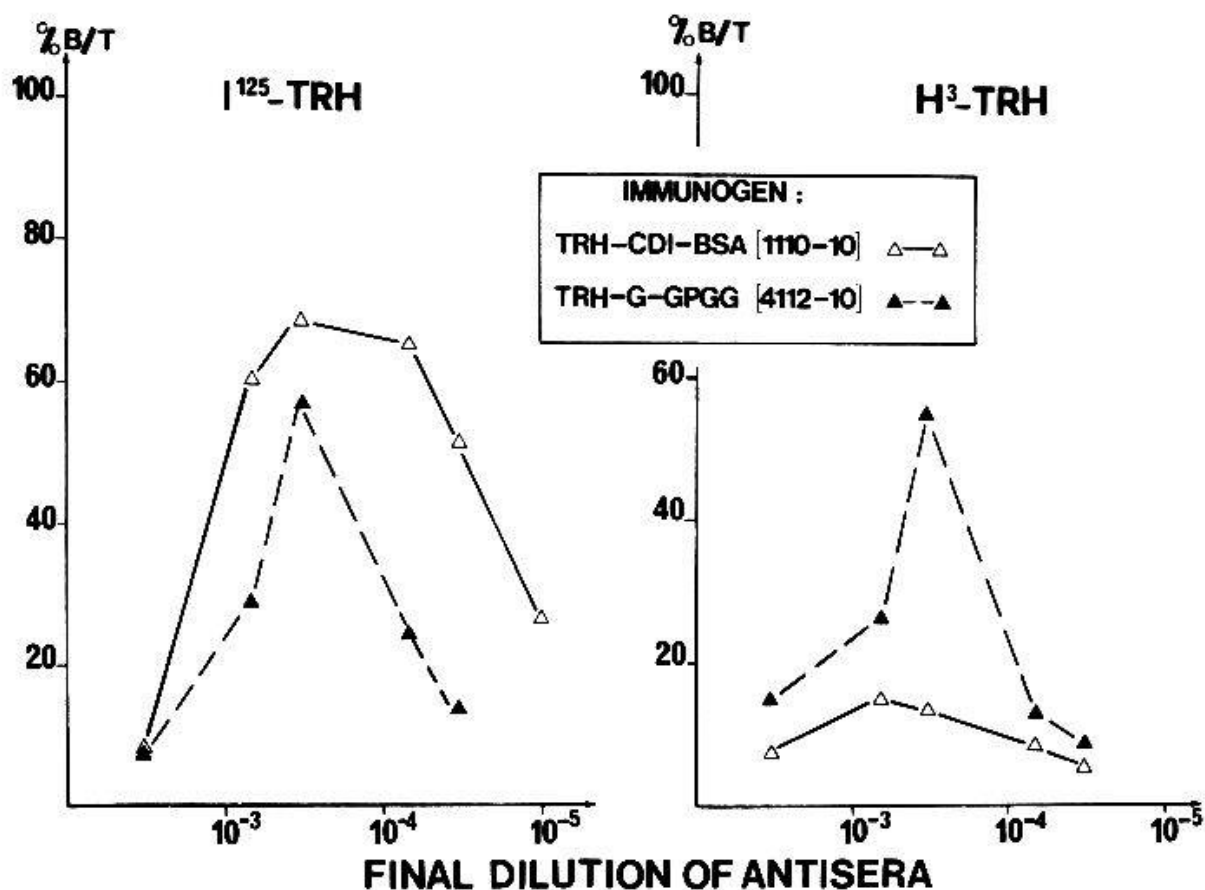


Fig. 3. Comparaison des courbes de titration de 2 immunosérums anti-TRH obtenus au moyen de 2 traceurs différents. Partie gauche = ^{125}I -TRH; partie droite = ^3H -TRH. La séparation du complexe est effectué au moyen d'un 2ème anticorps.

Dans le cas de la substance P, un problème très particulier de spécificité réside dans le fait que la molécule utilisée comme traceur, le $\text{Tyr}^8\text{-SP}$, n'est qu'un analogue structural de la substance P.

La fig. 4 montre les caractéristiques d'un IS-SP obtenu chez le lapin à partir de la substance P polymérisée à des γ -globulines de cobaye comme immunogène. Si un titre radioimmunologique très important et un dosage radioimmunologique très sensible sont obtenus à l'aide du ^{125}I - Tyr^8SP , cette sensibilité est encore plus grande si le déplacement de l'équilibre est effectué par le Tyr-SP . Ce fait n'a finalement rien de surprenant et signifie que les caractéristiques de liaison d'un tel IS pourraient être augmentées par l'utilisation d'un autre traceur tel que la SP elle-même ou bien un analogue ayant une affinité supérieure à celle du $\text{Tyr}^8\text{-SP}$. Néanmoins, la spécificité d'un tel système est excellente vis-à-vis d'autres peptides hypothalamiques connus. Seuls, entre autres, des extraits de noyau caudé, de substance noire et d'hypothalamus déplacent l'équilibre de ce système de manière identique à celle de la substance P.

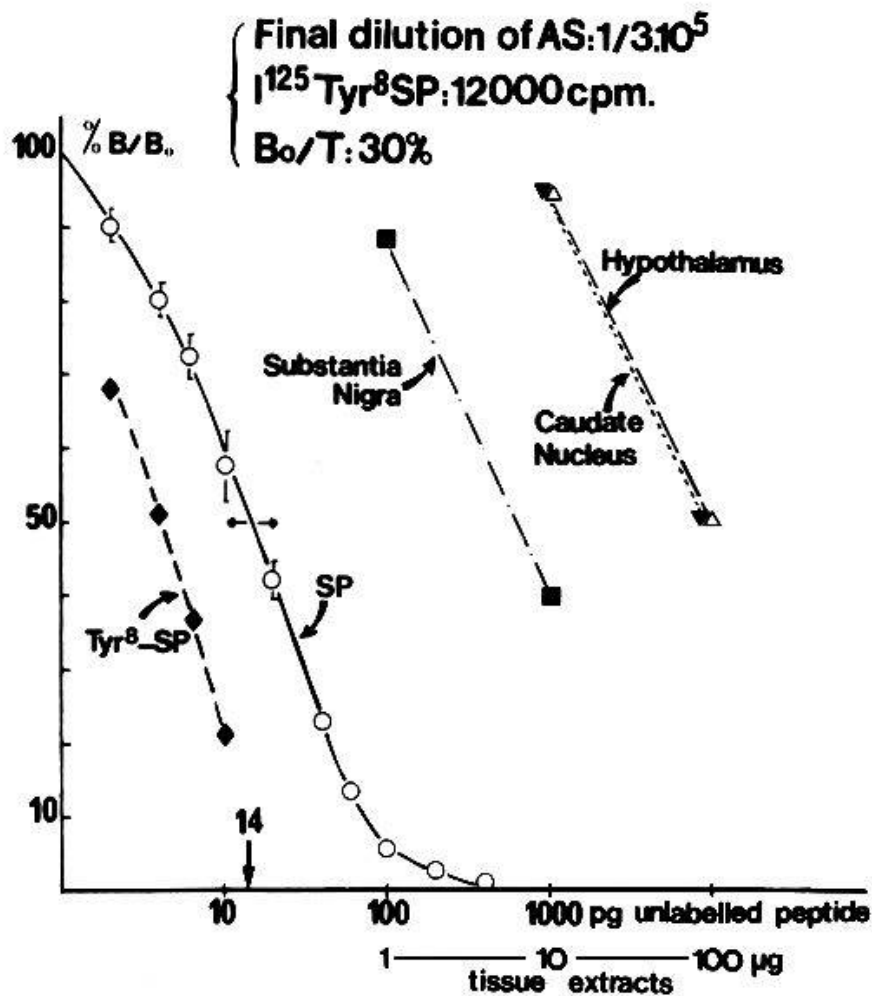


Fig. 4. Caractéristiques d'un dosage radioimmunologique de la substance P développé à partir d'un immunosérum obtenu après polymérisation de la substance P avec des γ -globulines de cobaye à l'aide du glutaraldéhyde. Le ^{125}I -Tyr⁸-SP est utilisé comme traceur. La séparation du complexe antigène-anticorps est effectuée au moyen d'un 2^{ème} anticorps.

III. Dosage radioimmunologique des neuropeptides

La validité du dosage radioimmunologique de tous les neuropeptides dans les tissus ou dans des milieux biologiques reste encore un sujet de discussion pour des raisons essentiellement liées au métabolisme de ces peptides.

A. Dosage dans des extraits de tissu nerveux

Les méthodes utilisées pour extraire les neuropeptides en vue de leur dosage sont généralement celles qui furent mises en oeuvre dans les premiers stades de la purification de ces peptides. Elles consistent, dans pratiquement tous les cas, en une homogénéisation dans un milieu acétone-acide. Cette technique a l'avantage d'inactiver les peptidases très largement présentes en grandes quantités dans pratiquement toutes les régions du système nerveux

(bibliographie dans MARKS, 1976). Néanmoins des résultats différents peuvent être trouvés si l'extraction est réalisée dans d'autres milieux. Dans le cas du LHRH, des milieux d'extraction ayant un ph neutre permettent d'enregistrer, en présence ou en absence d'inhibiteurs des activités peptidasiques, la présence de quantités importantes de LHRH aussi bien dans le cortex cérébral (cortex frontal) que dans l'hypothalamus. Par contre, après extraction dans un milieu à ph acide, aucune activité LH-RH n'est détectée dans des extraits de cortex frontal (KERDELHUE, 1977). Ces faits signifieraient, si l'on élimine un éventuel artefact de dosage qui seraient dû à des activités peptidasiques résiduelles en milieu d'extraction à ph neutre, qu'une ou différentes molécules de poids moléculaires élevés, contenant la séquence ou une partie de la séquence du LHRH, existeraient à la fois dans l'hypothalamus et dans le cortex. Par contre, le décapeptide n'existerait pas dans le cortex frontal. Des résultats similaires ont été aussi trouvés par BARNEA et PORTER (1975). Au niveau hypothalamique différentes familles de molécules de poids moléculaires voisins de celui du LHRH ont été aussi mises en évidence dans des conditions expérimentales qui permettent à priori d'exclure une adsorption du LHRH sur d'autres molécules (KERDELHUE et al., 1973; MILLAR et al., 1977).

Des phénomènes identiques ont été aussi observés dans le cas de la somatostatine (ARIMURA et al., 1975). Rien n'est actuellement connu de l'implication physiologique éventuelle de ces molécules contenant tout ou partie de la séquence du peptide isolé en fonction d'une activité biologique donnée.

Il existerait peut-être, dans ces derniers cas, des systèmes identiques à ceux mis en évidence pour d'autres neuropeptides. Dans le cas des endorphines et de l'ACTH d'origine hypophysaire un précurseur commun a été mis en évidence dans l'hypophyse sur des bases biochimiques (MAINS et al., 1977) et physiologiques (GUILLEMIN et al., 1977).

B. Dosage dans des milieux biologiques

S'il existe une certaine homogénéité dans les teneurs hypothalamiques trouvées par différents laboratoires, pour un même neuropeptide, et dans une même situation physiologique, il n'en est pas de même pour les concentrations sériques. Dans le cas du LHRH, les concentrations basales ne semblent pas pouvoir être détectées. Néanmoins, une augmentation se produisant au moment des pics préovulatoires des gonadotropines a été rapporté chez différentes femelles de mammifères mais avec des valeurs variant du pg/ml au ng/ml (bibliographie dans KERDELHUE, 1977). La raison de ces différences n'est actuellement pas connue. Il est possible que certaines valeurs élevées soient dues à des réactions croisées avec des

séquences partielles ou bien avec des molécules de poids moléculaires plus élevés que la molécule initiale. En fait, plusieurs espèces moléculaires immunologiquement apparentées, ont pu être mises en évidence après fractionnement du sérum par chromatographie (JEFF-COATE et HOLLAND, 1974). Il est aussi possible que les faibles valeurs soient dues à une rapide inactivation des peptides par les peptidases, soit *in vivo*, soit même au cours du dosage radioimmunologique. Des valeurs uniformément plus faibles (bibliographie dans KERDELHUE 1977) ont été rapportées pour le TRH sérique mais aucune variation n'a pu être mise en évidence dans des conditions où les concentrations sériques en TSH sont élevées. Les faibles valeurs pourraient être dues, dans ce dernier cas, à la différence, vis-à-vis des peptidases, entre le TRH et le ¹²⁵I-TRH uniformément utilisé comme traceur par les différents groupes, ce dernier n'étant pas susceptible d'être dégradé (MARTINO et al., 1977). Des difficultés du même type ont été rencontrées pour le dosage de ces peptides dans l'urine où, tout au moins dans le cas du LHRH et du TRH, seules des séquences partielles seraient présentes (REDDING et SCHALLY, 1973; GORDON et REICHLIN, 1973; BOLTON, 1974).

Conclusions

L'application de la technique radioimmunologique au dosage des neuropeptides pose, comme nous venons de le voir dans cet article, des problèmes très particuliers pour des raisons essentiellement liées à la structure et au métabolisme de ces peptides.

En raison de leur faible poids moléculaire, ils subissent tous, après introduction d'atomes d'iode, des modifications chimiques conduisant à des modifications de leurs activités biologiques et immunologiques.

En raison de leur absence de spécificité d'espèce, leur antigénicité est très faible et des couplages à d'autres molécules doivent être mis en oeuvre pour obtenir des immunosérums de titre suffisant. Néanmoins, si l'on sait que certains couplages doivent être évités pour obtenir des immunosérums relativement spécifiques, ces derniers ne restent que des entités très relatives.

En plus, quelle que soit la spécificité des immunosérums obtenus contre l'un ou l'autre neuropeptide, ils sont tous capables de reconnaître plus ou moins la séquence ou une partie de la séquence du neuropeptide engagée dans une molécule de poids moléculaire plus important. Finalement, la présence de peptidases, dont on ignore actuellement le degré de spécificité réel vis-à-vis de tel ou tel peptide constitue un obstacle permanent à de nombreuses études. Au travers de ces dernières considérations, une des applications possibles des techniques immunologiques à l'étude des neuropeptides pourrait consister en la préparation d'immun-

sérums contre les autres formes moléculaires et contre les activités peptidasiques pour étudier leurs implications physiologiques éventuelles.

Remerciements

Je remercie les Drs D. Gillesen et R.O. Studer (Hoffmann-La Roche, Bâle, Suisse) de m'avoir donné le LHRH et le TRH ainsi que leur différents analogues utilisés dans cette étude. Le ³H-TRH m'a été donné par les Drs J.L. Morgat et P. Fromageot (CEA, Saclay, France). Je remercie également Madame Y. Langlois de son excellente collaboration technique.

- Arimura, A., Sato, H., Kumasaka, T., Worobec, R.B., Debeljuk, L., Dunn, J.C. and Schally, A.V. (1973): *Endocrinology*, 93: 1092-1103.
- Arimura, A., Sato, H., Coy, D.H. and Schally, A.V. (1975): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148: 784-789.
- Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nishi, N. and Schally, A.V. (1975): *Science*, 189: 1007-1009.
- Barnea, A. and Porter, J.C. (1975): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67: 1346-1352.
- Bassiri, R.M. and Utiger, R.U. (1972): *Endocrinology*, 90: 722-727.
- Bolton, A.E. (1974): *J. Endocr.*, 63: 255-256.
- Brown, G.M., Van Loon, G.R., Hummel, B.C.W., Grotz, L.J., Arimura, A. and Schally, A.V. (1977): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 784-790.
- Dermody, W.C., Becuar, E.A., Windsor, B.L. and Reel, J.R. (1973): *Fed. Proc.*, 32: 239A, 153.
- Gordon, J.H. and Reichlin, S. (1973): *Endocrinology*, 93: 259-261.
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963): *Biochem. J.*, 89: 114-123.
- Guillemin, R., Vargo, T., Rossier, J., Minick, S., Ling, N., Rivier, C., Vale, W. and Bloom, F. (1977): *Science*, 197: 1367-1369.
- Jeffcoate, S.L. and Holland, D.T. (1974): *J. Endocr.*, 62: 333-340.
- Jeffcoate, S.L. and White, N. (1974): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38: 155-157.
- Jeffcoate, S.L. and Holland, D.T. (1975): *Acta Endocr. (Kbh.)*, 78: 232-238.
- Kerdelhué, B., Jutisz, M., Gillesen, D. and Studer, R.O. (1973): *Biochim. Biophys. Acta*, 297: 540-548.
- Kerdelhué, B., Jutisz, M., Gillesen, D., Kunzi, D. and Studer, R.O. (1973b): *Acta Endocr. (Kbh.)*, Suppl., 177, 197.
- Kerdelhué, B. (1977): In : *La biologie cellulaire des processus neurosecrétaires hypothalamiques*, édité by J.D. Vincent, éditions du C.N.R.S. (sous presse).
- Ling, N., Leppälüoto, J. and Vale, W. (1976): *Anal. Biochem.* 76: 125-133.
- Mains, R., Eipper, E. and Ling, N. (1977): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 3014-3018.
- Marchalonis, J.J. (1969): *Biochem. J.*, 113: 299-303.
- Marks, N. (1976): In: *Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology*, edited by F. Naftolin, K.J. Ryan and I.J. Davies, pp 129-147. Elsevier, Amsterdam.
- Martino, E., Seo, H., Refetoff, S. and Horwitz, D.L. (1977): In : *Program 59th Annual Meeting Endocrine Society Abstr. N° 139*.
- Millar, R.P., Aehnelt, C. and Rossier, G. (1977): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 720-731.

Pierpaoli, W. and Maestroni, J.M. (1977): *Cell. Immunology*, 31, 355-363.
Redding, T.W., and Schally, A.V. (1973): *Life Sciences*, 12: 23-27.
Visser, T.J., Docter, R. and Hennemann, G. (1974): *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 77: 417-421.

Adresse de l'auteur: Dr B. Kerdelhué, Laboratoire des Hormones peptidiques C.N.R.S.,
F-91190 Gif-sur-Yvette (France)

