

Université du Québec

INRS-Santé

Anticorps monoclonaux et isomorphisme de la LH

par

**Caroline Chabot
baccalauréat en biologie**

**Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître-ès-sciences (M.Sc.)**

Jury d'évaluation

Examinatrice externe :

Dre Julie Lafond

Examineur interne :

Dr Daniel Cyr

Directeur de recherche :

Dr Guy R. Brisson

Co-directeur de recherche :

Dr Sam Cooper

30/10/98

© Droits réservés de Caroline Chabot

Résumé

En 1993, à l'occasion du II^e Symposium International sur les drogues dans les sports et dans le but d'appuyer la sonde première basée sur l'expression du rapport testostérone/épitestostérone (T/E), l'équipe de Cowan de Londres dévoilait son intention de mettre au point une sonde complémentaire, le rapport urinaire testostérone/lutropine (T/LH). Cette nouvelle sonde reposerait sur le principe voulant qu'une augmentation de la testostérone circulante favorise une baisse en LH, avec élévation consécutive du rapport T/LH. Ainsi, une telle sonde pourrait venir en appui au rapport T/E et en faciliter l'interprétation dans des conditions de manipulations stéroïdiennes de plus en plus habiles de la part des athlètes.

Toutefois, il s'avéra rapidement que la mesure immunométrique de la LH urinaire présentait des inconsistances, rendant une telle sonde inutilisable à court terme, du moins dans un contexte de lutte au dopage hormonal chez les athlètes. En effet, un rapport urinaire T/LH anormalement élevé devrait, selon la physiologie classique, découler d'un effet inhibiteur de l'administration de testostérone sur la sécrétion hypophysaire de LH; ce n'est toutefois pas ce qui s'observe : alors que les valeurs de la testostérone urinaire sont mesurées avec précision par techniques spectrophotométriques, la quantification immunométrique faite actuellement de la LH urinaire par les différents laboratoires accrédités par le comité international olympique (CIO) révèle des résultats inexploitable tant les valeurs mesurées sont disparates et discordantes. Ainsi, l'objectif poursuivit tout au long de cette étude fut d'examiner la performance des principales trouses immunométriques mises sur le marché pour la mesure de la LH afin de tenter de comprendre la ou les raisons des inconsistances observées.

Une première série de protocoles ont porté sur l'examen de différentes conditions liées à la conservation des urines. L'examen de la littérature pertinente s'est par la suite, particulièrement attardé aux carences liées à l'étalonnage des trouses de mesure de la

LH. L'essentiel des étalons utilisés provient de matrice le plus souvent bien différentes de celles soumises habituellement à l'analyse. L'examen de la littérature a montré l'existence indiscutable d'une multitude d'isoformes de la LH tant en milieux sanguins qu'urinaire. Ces différences espèces moléculaires de LH découlent essentiellement des arborisations sucrées branchées sur la chaîne protéique primaire de la molécule.

Les manipulations visant la purification de la LH à des fins antigéniques modifient ces arborisations et conduisent à la production d'anticorps anti-LH dont le paratope ne correspond plus à l'épitope initialement recherché. Dans un protocole expérimental où les principales trouses destinées à la mesure immunométrique de la LH furent examinées, nous avons, en utilisant divers anticorps de capture en système croisé, mis en évidence des différences considérables dans la mesure d'une même urine. Le protocole utilisé a permis de démontrer que ces différences analytiques découlent de la présence d'isoformes de la LH dans un même échantillon qui ne peuvent être également quantifiés par les différents anticorps mis en marché. Les étalonnages inadéquats, jumelés à l'existence en milieux biologiques de multiples glycoformes, couplés à la banalisation antigénique découlant des purifications nécessaires à la production d'anticorps, sont tous des facteurs expliquant facilement les inconsistances des rapports T/LH observés en laboratoires dédiés à la lutte au dopage chez les sportifs. De plus, l'utilisation en milieu clinique d'une seule et même trousse anti-LH pour quantifier la LH, cela indépendamment des états physiologiques prévalants, soulève un questionnement inquiétant.

Remerciements

Je voudrais remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de l'INRS-santé et, plus particulièrement, madame Marlène Fortier pour son aide technique et son amitié.

Je tiens également à remercier le docteur Gilles F. Brisson, biochimiste à la Cité de la Santé de Laval, madame Claudia Di Schiavi, représentante à la compagnie Wallac Canada et le docteur Alain Fournier de l'INRS pour leur collaboration soutenue.

Je voudrais aussi témoigner ma gratitude à mon directeur de maîtrise, le docteur Guy Brisson, pour l'aide et le soutien qu'il m'a apporté tout au long de mes travaux de recherche. Sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements m'ont permis de mener à terme ce projet d'étude. Je veux également remercier sincèrement mon co-directeur de recherche, le docteur Sam Cooper.

Table des matières

| | |
|---|------------|
| RÉSUMÉ | IIV |
| REMERCIEMENTS | VI |
| LISTE DES FIGURES | IX |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XI |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 <u>Le prétexte</u>..... | 1 |
| 1.2 <u>Objectif</u>..... | 4 |
| 1.3 <u>Hypothèse de travail</u> | 4 |
| LA REVUE DE LITTÉRATURE | 6 |
| 2.1 <u>Les gonadotrophes : des cellules sous haute surveillance</u> | 6 |
| 2.2 <u>La synthèse et le largage de la LH</u>..... | 9 |
| 2.2.1 <u>Les chaînes primaires</u>..... | 9 |
| 2.2.1.1 <u>L'hétérogénéité structurelle</u> | 100 |
| 2.2.1.2 <u>La configuration de l'hormone</u> | 13 |
| 2.2.1.3 <u>La glycosylation</u>..... | 15 |
| 2.2.1.3.1 <u>La nature des sucres</u> | 17 |
| 2.2.1.3.2 <u>L'arrangement des sucres</u> | 18 |
| 2.2.1.3.2.1 <u>La structure pentamérique biantennée</u>..... | 18 |
| 2.2.1.3.2.2 <u>La structure distale spécifique</u>..... | 19 |
| 2.2.1.3.3 <u>Le rôle des oligosaccharides</u>..... | 20 |
| 2.2.1.4 <u>La bioactivité et le potentiel biologique</u>..... | 22 |
| 2.2.1.5 <u>La demi-vie et l'épuration</u> | 24 |
| 2.2.1.6 <u>La reconnaissance immunologique</u>..... | 25 |
| 2.3 <u>La physiologie de la LH</u> | 29 |
| 2.3.1 <u>Les relations gonades - tandem hypothalamo-hypophysaire</u> | 29 |
| 2.3.2 <u>Les récepteurs</u>..... | 31 |
| 2.3.3 <u>Les mécanismes de reconnaissance de la cible</u> | 32 |
| 2.4 <u>L'étalonnage</u>..... | 34 |
| 2.4.1 <u>Les premières préparations internationales de référence</u>..... | 34 |
| 2.4.2 <u>La titration biologique in vitro</u> | 39 |
| 2.4.3 <u>La séparation par focalisation isoélectrique</u>..... | 41 |

| | |
|--|----------------|
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | 48 |
| 3.1 <u>Étude de stabilité des urines</u> | 50 |
| 3.2 <u>Étude des effets de la congélation des urines</u> | 51 |
| 3.3 <u>Modification de la matrice urinaire</u> | 52 |
| 3.3.1 <u>Extraction à l'acétone</u> | 53 |
| 3.3.2 <u>Traitement au glycérol</u> | 54 |
| 3.3.3 <u>Traitement à l'urée</u> | 54 |
| 3.3.4 <u>Traitement à l'albumine</u> | 55 |
| 3.3.5 <u>Traitement à l'acide ascorbique</u> | 55 |
| 3.3.6 <u>Traitement au polyéthylèneglycol (PEG)</u> | 55 |
| 3.4 <u>Urates et phosphates</u> | 56 |
| 3.5 <u>Deux systèmes monoclonaux</u> | 57 |
| 3.6 <u>Effet de la neuraminidase</u> | 61 |
| 3.7 <u>Chromatographie par immunoaffinité</u> | 61 |
| 3.8 <u>Séparation par immunoaffinité</u> | 63 |
| RÉSULTATS..... | 64 |
| 4.1 <u>Étude de stabilité</u> | 64 |
| 4.2 <u>Effets de la congélation</u> | 65 |
| 4.3 <u>Modification de la matrice urinaire</u> | 66 |
| 4.4 <u>Urates et phosphates</u> | 69 |
| 4.5 <u>Deux systèmes monoclonaux</u> | 70 |
| 4.6 <u>Effet de la neuraminidase</u> | 74 |
| 4.7 <u>Chromatographie par immunoaffinité</u> | 75 |
| 4.8 <u>Séparation par immunoaffinité</u> | 77 |
| DISCUSSION..... | 79 |
| CONCLUSION | 99 |
| LISTE DES RÉFÉRENCES | 104 |

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématisée des transformations opérées à la molécule de lutropine au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi..... 14

Figure 2. Présentation schématique des inter-relations entre onze différents anticorps monoclonaux tous dirigés contre la LH. Chacune des figures ovales représente l'épitope reconnu par un de ces onze anticorps monoclonaux. La couleur de ces ovales indique si l'épitope est continu sur la sous-unité β (fuchsia) ou sur la sous-unité α (brun) ou bien discontinu, se prolongeant sur les deux sous-unités de la LH (bleu). Les X indiquent l'incompatibilité des deux anticorps qu'ils relient.....27

Figure 3. Modélisation de l'hétérogénéité moléculaire de la LH et des anticorps anti-LH. Cette représentation montre des espèces moléculaires de hLH dotées de pics isoélectriques situés à des pH entre 6 et 9. Le vert montre pour chacune des espèces la bioactivité relative de la molécule, alors que le jaune représente la portion non-bioactive de la molécule. Ce modèle veut illustrer que différentes isohormones peuvent varier entre elles dans leur bioactivité lutropique. Les lettres A, B, C, D et E représentent la spécificité de paires d'anticorps anti-LH, démontrant schématiquement que certains de ces anticorps sont spécifiques pour diverses zones bioactives alors que d'autres ne reconnaissent que des zones non-bioactives46

Figure 4. Représentation schématique de la loi d'action de masse où k_1 représente la constante d'association AgAc, k_2 la constante de dissociation AgAc, Ag la concentration en antigènes libres, Ac la concentration en anticorps libres et AgAc la concentration du complexe antigène-anticorps61

Figure 5. Expression de la constante d'affinité K où k_1 représente la constante d'association $AgAc$, k_2 la constante de dissociation $AgAc$, Ag la concentration en antigènes libres, Ac la concentration en anticorps libres et $AgAc$ la concentration du complexe antigène-anticorps 62

Figure 6. Appauvrissement en LH urinaire tel que mesuré par le système analytique MAIACLONE (Serono) après 180 minutes d'extraction par immunoaffinité en remplaçant, à chacun des temps indiqués, la bille (phase solide) porteuse d'anticorps monoclonaux anti-LH $\alpha\beta$ par une nouvelle75

Figure 7. Appauvrissement en LH urinaire tel que mesuré par le système analytique commercialisé par la firme CIBA après 180 minutes d'extraction par immunoaffinité en déposant, à chacun des temps indiqués, une nouvelle bille (phase solide) porteuse d'anticorps monoclonaux anti-LH $\alpha\beta$ commercialisés par la même firme pharmaceutique à titre d'anticorps de capture pour la LH76

Figure 8. Valeurs de la lutropine dans un même échantillon soumis à une chromatographie d'affinité utilisant tour à tour chacun des anticorps monoclonaux anti-lutropine utilisés pour la capture antigénique dans chacune des cinq trouses commerciales, lesquelles furent tour à tour utilisées pour quantifier la lutropine restante après 0, 30, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes d'exposition, la charge d'anticorps extracteur (capture) étant renouvelée à chacun des temps pré-cités77

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I. Analyse de dix échantillons d'urine d'athlètes reconnus pour abus de testostérone ($T/E > 6,0$). Les valeurs présentées sont celles de la testostérone (T), de l'épitéstostérone (E) et de la lutropine (LH) étalonnée avec le 1 ^{er} IRP 68/40 (Cowan et kicman, 1993) | 3 |
| Tableau II. Teneur en LH du 1 ^{er} IRP-hPG (WHO 69/104) en regard des autres étalons disponibles (Bangham et al., 1973) | 37 |
| Tableau III. Valeurs de la LH immunoréactive (RIA) de la préparation de référence WHO 69/176 constituée d'un pool de hLH plasmatique obtenues de femmes ménopausées et telles que mesurées par six laboratoires indépendants (adapté de Bangham et al., 1973) | 38 |
| Tableau IV. Identification des anticorps utilisés par chacune des cinq firmes commerciales pour capturer et reconnaître l'antigène considéré, soit la LH. Le substantif anti-holo pourrait être substitué à anti-intact, les deux désignant un paratope nécessitant les deux sous-unités de la lutropine. Éliisa : Enzyme linked immunoabsorbent assay; ICMA : titration par immunochemiolumétrie; EIA : titration immunoenzymatique; IRMA : titration immunoradiométrique. La préparation utilisée pour l'étalonnage de chacune des trousse est également mentionnée | 49 |
| Tableau V. Coefficients de variation (%) qualifiant la précision (intra-essai) et la fidélité (inter-essai) des mesures de la LH par les cinq systèmes analytiques utilisés, tels que décrits par les compagnies..... | 50 |

Tableau VI. Valeurs de la lutropinurie avant et après une exposition de 60 minutes à des milieux acides (pH 2,5) ou alcalins (pH 11,0). Les chiffres en indice se veulent pour 1 : valeurs non détectables, pour 2 : écart à la valeur initiale64

Tableau VII. Effets de l'absence ou de la présence de multiple (0 à 4) périodes d'exposition de 24 heures chacune à -17°C sur les valeurs de la lutropinurie (mUI/ml) de dix échantillons différents d'urine65

Tableau VIII. Effets de modifications matricielles sur la mesure de la lutropinurie avant (X) et après (Y) une période de 24 heures de congélation à -17°C 66

Tableau IX. Valeurs de la lutropinurie avant (chiffres à gauche de la colonne) et après (chiffres à droite de la colonne) congélation de huit échantillons urinaires différents soumis à différents traitements. Pour l'acétone, il s'agit plutôt d'une extraction préalable67

Tableau X. Valeur de la lutropinurie telles que quantifiées au moyen d'un système analytique utilisant un anticorps polyclonal, avant (valeurs à gauche de la colonne) et après (valeurs à droite de la colonne) congélation de huit échantillons urinaires différents soumis à différents traitements. Pour fins de comparaison, les effets de la congélation sur la valeur de la lutropinurie telle que mesurée par le système radioimmunométrique (Mab), sont présentés pour chacun des huit échantillons mesurés (colonne marron).....68

Tableau XI. Valeurs de la lutropinurie (mUI/ml) sans aucune précipitation (Nil) et avec précipitation soit des urates, soit des phosphates ou soit des deux.....69

Tableau XII. Valeurs de la lutropinurie (mUI/ml) avant et après précipitation des urates et phosphates..... 70

Tableau XIII. Valeurs de la lutropinurie telles que mesurées par techniques IRMA et IFMA avant et après congélation de 12 échantillons traités ou non à l'albumine et à l'urée. Légende : Cy = cycle menstruel; M = phase menstruelle; F = phase folliculaire; L = phase lutéale; O = ovulation. L'utilisation des couleurs est expliquée dans le texte.....71

Tableau XIV. Valeurs de la lutropinurie déterminées aux différents stades du cycle menstruel chez une même personne72

Tableau XV. Valeurs de la lutropinurie telles qu'appréciées par deux systèmes analytiques pour chacune des mictions d'un individu au cours d'une même journée72

Tableau XVI. Lutropinurie chez deux cohortes masculines établies en fonction de l'âge et telle que mesurée par les deux systèmes analytiques de type sandwich. Les valeurs de la créatinurie furent utilisées pour corriger les valeurs hormonales.....73

Tableau XVII. Effets d'ajouts de neuraminidase sur la lutropinurie avant et après une période de six jours de congélation sur les valeurs de la lutropinurie telles que mesurées par deux systèmes analytiques (IRMA de Serono et IFMA de Wallac).....74

Tableau XVIII. Effet de la présence ou de l'absence d'une période d'incubation de 60 minutes à 37°C sur les valeurs de la lutropinurie (variation en % et valeurs absolues en rouge) d'une urine obtenue d'un jeune mâle adulte et traitée à différentes concentrations de neuraminidase et telles que mesurées au moyen de deux systèmes analytiques (IRMA de Serono et IFMA de Wallac).....74

Tableau XIX. Valeurs de la lutropinurie telles que mesurées au moyen de cinq différents systèmes de titrations immunométriques avant (valeurs à gauche de la flèche) et après (valeurs à droite de la flèche) six périodes d'immuno-extraction de 60 minutes chacune. Les symboles α et β entre parenthèses veulent indiquer la qualité des paratopes des anticorps de capture et de marquage propres à chacun des systèmes analytiques utilisés.....78

Tableau XX. Modification de la présentation faite au Tableau 6 mettant en relief la quantification sensiblement plus faible (chiffres blancs du bloc marron) de la lutropinurie faites par trois trousse commerciales (Ciba, Roche et BMC) sur un même échantillon comparativement aux trousse commerciales de Sérono et de Wallac (chiffres blancs du bloc fuchsia)..... 93

Tableau XXI. Modifications de la présentation faite au Tableau 6 mettant en relief la capacité particulière d'extraction (de capture) de l'anticorps monoclonal de la firme Roche (trame violette), capacité appréciée par l'ensemble des cinq trousse utilisées pour mesurer la lutropinurie.....94

Tableau XXII. Modification de la présentation faite au Tableau 6 mettant en relief la capacité sélective d'extraction (de capture) de l'anticorps monoclonal de la firme BMC (trame violette).....95

Tableau XXIII. Présentation identique à celle du Tableau 6 mais mettant en relief (trame violette) la mesure par les trousse de Serono et de Wallac de valeurs résiduelles de LH après les extractions successives au moyen du Mabs anti- β de la firme Wallac.....96

Tableau XXIV. Présentation identique à celle du Tableau 6 mais mettant en relief (trame violette) les propriétés différentes d'extraction du Mabs anti $\alpha\beta$ de la firme CIBA.....97

Chapitre 1

Introduction

1.1 Le prétexte

Dans un environnement de travail dédié au dépistage de l'utilisation illicite d'agents ergogènes par les athlètes, point n'est nécessaire de discourir sur l'existence des abus de testostérone par certains athlètes: d'autres s'en sont chargés à meilleur titre.

Le travail qui sera présenté voudrait par contre profiter de ce prétexte pour forcer l'interrogation vers de nouvelles frontières, sur des voies qui apparaissent novatrices, lesquelles notamment pourraient éventuellement faciliter le dépistage de l'abus de certaines hormones, celles issues du génie génétique et identiques aux hormones dites naturelles. L'utilisation illicite de telles substances confrontent le chercheur : comment dissocier dans l'organisme les hormones normalement relarguées par le tissu glandulaire d'autres identiques mais ajoutées aux premières par administration exogène à des fins ergogènes.

La chimie analytique est le plus souvent dépourvue face au dépistage de l'abus d'hormones peptidiques naturelles car les substances incriminées ne peuvent se soumettre à l'analyse spectrale en raison de leurs poids moléculaires trop importants. Ainsi la mesure de ces hormones demeure problématique car dépendante essentiellement d'approches analytiques biologiques et non chimiques.

La présentation qui sera faite ne s'intéressera ni à la somatotropine ni à l'érythropoïétine ou à l'hémoglobine réticulée; elle focalisera plutôt sur la lutropine (LH), une hormone glycoprotéique non encore quantifiable et qualifiable par techniques chimico-analytiques. L'intérêt pour cette stimuline est directement lié aux abus de testostérone : avec ce stéroïde, elle forme un couple fonctionnel indiscutable dont les grandes lignes sont connues depuis des décennies.

Personne ne contestera que l'induction d'une hypertestostéronémie devrait se traduire par une hypolutropinémie et, éventuellement, par une hypolutropinurie. Prenant assise sur cette physiologie voulant qu'une augmentation de la testostéronémie (raisons endogènes ou exogènes) favorise une baisse de la lutropinémie, plusieurs ont alors cru qu'une sonde basée sur l'expression d'un rapport testostérone sur LH (T/LH) pourrait s'avérer utile et complémentaire dans le départage de certains athlètes qu'on croit abuseurs de stéroïdes : en raison des effets anti-sécrétagogues de la testostérone sur la LH, ledit rapport s'affaîsserait lors de l'induction d'une hypertestostéronémie.

Pourtant, et en dépit de l'apparente simplicité de la relation entre LH et testostérone, tous doivent reconnaître leur incapacité à utiliser une telle sonde dans les conditions actuelles. En effet, l'ensemble des analyses effectuées chez des individus suspendus pour dopage à la testostérone révèlent des rapports urinaires T / LH incompatibles avec les enseignements classiques de la physiologie : les hypertestostéronuries observées étaient le plus souvent aucunement associées avec des hypolutropinuries.

Une étude présentée par Cowan et Kicman en 1993 le confirme : un rapport T / E¹ supérieur à 6,0 (indicateur d'un abus de testostérone) n'est pas toujours associé à un rapport T / LH élevé.

E¹ = épitestostérone

Le tableau I ci-dessous présente les observations faites par ce groupe anglais et met en évidence l'instabilité de la sonde T/LH. À titre d'exemple et en se référant à ce tableau, une testostéronurie de 558 nmol/L (#1) est associée à une lutropinurie de 0,09 UI/L pour un rapport T / LH de 6200, alors qu'une testostéronurie moindre, soit de 61 nmol/L (#4), est quant à elle associée à une lutropinurie inexplicablement moindre (0,03 UI/L), pour un rapport T / LH du tiers, soit de 2033 nmol/UI.

Comment également interpréter les résultats des échantillons #7 et #10 présentant des valeurs de testostérone urinaire comparables mais dont les valeurs correspondantes de la lutropinurie sont dans un cas (#7) de 0,05 UI/L et dans l'autre (#10) de 2,63 UI/L.

| Échantillon | T nmol/L | E nmol/L | LH UI/L | T / E | T / LH Nmol/UI |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------|-------------------|
| 1 | 558 | 3,5 | 0,09 | 159,4 | 6 200 |
| 2 | 10 714 | 76,3 | 0,20 | 140,4 | 53 570 |
| 3 | 924 | 11,4 | 0,16 | 81,1 | 5 775 |
| 4 | 61 | 1,0 | 0,03 | 61,0 | 2 033 |
| 5 | 4 733 | 168,9 | 0,05 | 28,0 | 94 660 |
| 6 | 277 | 11,1 | 3,03 | 25,0 | 91 |
| 7 | 25 | 1,0 | 0,05 | 25,0 | 500 |
| 8 | 298 | 30,5 | 6,23 | 9,8 | 48 |
| 9 | 104 | 12,1 | 0,09 | 8,6 | 1 156 |
| 10 | 23 | 2,8 | 2,63 | 8,2 | 9 |

Tableau I. Analyse de dix échantillons d'urine d'athlètes reconnus pour abus de testostérone (T/E > 6,0). Les valeurs présentées sont celles de la testostérone (T), de l'épitéstostérone (E) et de la lutropine (LH) étalonnée avec le 1^{er} IRP 68/40 (Cowan et Kicman, 1993).

1.2 Objectif

Ce mémoire s'est donc fixé comme objectif principal d'examiner les possibles causes invalidant les résultats d'une sonde anti-dopage basée sur la mesure de la LH, notamment en analysant et comparant les principales trousse immunométriques utilisées universellement pour la mesure de la LH, mais aussi par l'analyse du comportement de la LH dans sa matrice urinaire, ce que nous élaborerons dans les pages qui suivent. Ainsi, pourrions-nous mettre en évidence le besoin de systèmes analytiques plus spécifiques.

1.3 Hypothèse de travail

L'hypothèse fondamentale que nous formulons est la suivante: considérant les approches analytiques utilisées pour déterminer la LH urinaire, nous croyons que l'incapacité actuelle à utiliser les valeurs de la lutropinurie découle en tout ou en partie d'une incapacité à bien évaluer le nombre des molécules de LH excrétées.

Les protocoles expérimentaux qui seront dessinés voudront mettre en évidence cette carence, une incapacité analytique liée à l'existence d'isoformes de la LH. En préambule aux protocoles expérimentaux, la section qui suit immédiatement a voulu démontrer avec le plus d'emphase possible la qualité de la mécanique assurant la biosynthèse et le largage de la LH dans le torrent circulatoire.

Une telle démonstration nous est apparue essentielle afin que le lecteur comprenne bien:

- ✓ la surveillance étroite exercée sur la biosynthèse de la LH;
- ✓ la mise en circulation non-aléatoire d'isoformes de la LH;
- ✓ la limite de l'exactitude des étalons de LH disponibles sur le marché;

Une telle sensibilisation du lecteur devrait faire ressortir l'état primitif dans lequel se situe aujourd'hui la mesure de la lutropine tant sérique qu'urinaire.

Chapitre 2

La revue de littérature

2.1 Les gonadotrophes : des cellules sous haute surveillance

La LH est une molécule de type glycoprotéique composée de deux sous-unités : les sous-unités α (alpha) et β (beta). La première, la sous-unité α , est spécifique à l'espèce et se retrouve dans plusieurs des hormones adénohypophysaires : la folliculostimuline (FSH), la LH (LH), la thyrostimuline (TSH), tout comme dans la composition de l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG). Pour sa part, la sous-unité β est spécifique à l'hormone, donc unique pour chacune d'elles, dont la LH (Green, Boime et Baenziger, 1986; Dufau et Veldhuis, 1987). Les synthèses de ces deux sous-unités sont indépendantes l'une de l'autre, au moyen d'ARN messagers qui leur sont spécifiques.

Comme l'indique son nom, le facteur de libération des gonadostimulines, le GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) stimule la libération de la LH et de la FSH. Une fois relâché par l'hypothalamus dans le système-porte hypothalamo-hypophysaire, le GnRH se lie de manière très spécifique aux récepteurs des cellules gonadotrophes de l'hypophyse, éléments responsables de la synthèse des gonadostimulines LH et FSH. Les pulsations de GnRH régularisent ainsi la biosynthèse des gonadotropines en influençant le niveau moyen d'ARNm, donc de leurs sous-unités respectives. Une augmentation de la fréquence pulsatile des GnRHs se traduit par un accroissement de l'expression du gène LH_{β} , optimisant ainsi la sécrétion de LH. Le contraire est tout aussi vrai : une diminution de la fréquence pulsatile des GnRHs diminue l'expression du gène LH_{β} , induisant de ce fait une diminution dans la synthèse de la LH (Beitins et Padmanabhan, 1991).

Pour sa part, la sous-unité α se retrouve moins sous la tutelle régularisatrice que représente la fréquence des pulsations de GnRH. Toutefois, étant produite en excès, elle ne représente pas un facteur déterminant majeur du niveau de biosynthèse de la LH.

Selon une étude de Kaiser et collaborateurs (1995) traitant des variations hormonales quantitatives en LH et en FSH, l'expression des sous-unités β et α de la LH serait stimulée optimalement lors d'une imprégnation cellulaire élevée par le GnRH dans l'environnement des récepteurs des cellules gonadotrophes. Concernant ces mêmes cellules, l'expression du gène FSH β serait plutôt optimisée lors d'une imprégnation plus faible des récepteurs en GnRH. Il existerait donc un mécanisme différent par lequel les GnRHs régulariseraient aux GnRHs. Ainsi, l'expression des sous-unités α et LH β serait maximale lorsque les concentrations de GnRHs liés aux récepteurs sont augmentées, tandis que l'expression de la sous-unité FSH β serait maximale surtout en présence de faibles concentrations de GnRH. Donc, des différences de fréquences et d'amplitudes des pulsations de GnRH régulariseraient les niveaux de LH et FSH au sein de la même cellule. Un seul ligand pourrait donc agir sur un récepteur unique de la cellule gonadotrophe dans le but de régulariser la synthèse de la LH et de la FSH (Kaiser et al., 1995).

La relâche pulsative de la LH hypophysaire dans le système circulatoire est influencée soit directement à son origine et/ou soit indirectement à l'hypothalamus par les stéroïdes que sont les androgènes et les œstrogènes (Santen, 1981; Kerrigan, Veldhuis et Rogol, 1994). Ces stéroïdes sont en fait sécrétés des gonades par un effet stimulant de la LH sur ces dernières. Existe donc une boucle fermée où la quantité des stéroïdes circulants influence tant la quantité que la qualité de la LH relâchée dans le torrent circulatoire (Hutchinson, 1988). Ainsi, ces hormones sexuelles stéroïdiennes peuvent exercer un rôle majeur dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, et cela en fonction des espèces, de l'âge, du sexe et des conditions physiologiques prévalant.

Qu'elle soit endogène ou exogène, une élévation de la teneur en hormones stéroïdiennes inhibe la sécrétion de la LH; le phénomène contraire existe également : une baisse des niveaux circulants en stéroïdes engendre une augmentation de la synthèse de la LH, favorisant ainsi la sécrétion des stéroïdes sexuels.

La littérature pertinente souligne également l'importance des catécholamines dans la régulation de la sécrétion de la LH. Celles-ci, surtout les endogènes, inhibent la sécrétion de la LH; elles potentialisent également l'effet inhibiteur des peptides opiacés sur la sécrétion lutropique en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ainsi, les stéroïdes, les opiacés et les catécholamines contrôlent-ils les quantités de LH sécrétées (Fujimoto et al., 1993).

De manière succincte :

- ✓ la LH et la FSH sont synthétisées dans la même cellule gonadotrope, de faibles fréquences pulsatiles de GnRH favorisant la synthèse et la relâche de la FSH, alors que de hautes fréquences pulsatiles de GnRH favorisent la synthèse et la relâche de LH. Les sécrétions de LH et FSH sont donc différemment régulées.
- ✓ dans les cellules gonadotrophes, la synthèse des sous-unités α et β dépend des ARNm et la quantité d'ARNm de la sous-unité β constitue le facteur limitant.
- ✓ des facteurs neuroendocriniens, mais surtout gonadiques, régularisent la quantité et la qualité de la LH sécrétée dans la circulation. Les patrons de sécrétion de la LH chez la femme sont donc distincts de ceux de l'homme.

2.2 La synthèse et le largage de la LH

2.2.1 Les chaînes primaires

Sans vouloir être iconoclaste, il convient de rappeler que les hormones LH, FSH, TSH et hCG forment une famille de glycoprotéines, chacune étant constituée de deux sous-unités (α et β) associées entre elles par des liens non-covalents. Les sous-unités α de toutes ces hormones sont formées d'une séquence identique d'acides aminés codée par un seul gène localisé sur le chromosome 6; les sous-unités β sont codées par des gènes différents, dont ceux attribués à la LH se retrouvent sur le chromosome 19; ils possèdent une séquence distincte d'acides aminés conférant la spécificité biologique de l'hormone (Green, Boime et Baezinger, 1986; Wilson, Leigh et Chapman, 1990; Clough et al., 1992; Pigny et al., 1992; Schwartz, 1995). La sous-unité α comporterait 89 acides aminés et cinq ponts disulfures, alors que la sous-unité β posséderait 115 acides aminés et six ponts disulfures, le poids moléculaire de la LH étant de 28,000 daltons (Pierce et Parsons, 1981; Mitchell et al., 1995b). Dans sa configuration tridimensionnelle, la LH comporte considérablement plus de feuillets β et de β -turn que d'hélices α , ce qui semble compatible avec la mesure d'un contenu élevé en proline (Pierce et Parsons, 1981). En général, l'intégrité des ponts S-S et la configuration tridimensionnelle (permettant l'exposition de certains domaines) semblent des conditions nécessaires à la bioactivité de l'hormone et à sa liaison au récepteur. Cependant, les domaines servant à la liaison des sous-unités α - β ne sont pas les mêmes que ceux servant à la liaison de l'hormone au récepteur (Pierce et Parsons, 1981).

Les deux sous-unités sont glycosylées sur des résidus spécifiques et le degré de glycosylation semble moduler le degré d'activité biologique de la LH. Ainsi, on a décrit que la sous-unité α comporterait deux sites de glycosylation, soit sur les résidus arginine 52 et 78, alors que la sous-unité β ne posséderait qu'un seul site de glycosylation situé sur l'arginine 30 (Martin-Du-Pan, Horak et Bischof, 1994).

2.2.1.1 L'hétérogénéité structurelle

L'hétérogénéité des hormones peptidiques constitue un phénomène bien connu, particularité qui n'est pas sans inciter à un questionnement sur la validité analytique ainsi que sur la signification clinique de leurs mesures. Selon l'état et la phase endocrinophysiologique, mais également selon le sexe et l'âge des sujets en cause, différentes formes de gonadotropines sont synthétisées et relâchées en circulation (Hutchinson, 1988). L'existence d'isoformes pour la LH tant sérique qu'urinaire, demeure des plus problématiques (Ding et Huhtaniemi, 1991). Cette hétérogénéité se traduit par des activités immunologiques, tant *in vitro* qu' *in vivo*, disparates, peu concordantes et souvent non significatives.

Ainsi, dans un même pool de LH d'origines diverses (urinaire, hypophysaire ou sérique), certaines molécules de LH posséderont:

- ✓ des points isoélectriques (pI) différents;
- ✓ des poids moléculaires différents;
- ✓ des contenus en hydrates de carbone sur leurs chaînes de glycosylation différents;
- ✓ même des séquences N- et C-terminales différentes, et cela pour les sous-unités α et β (Stanton et al., 1993).

Les sources de ces variations sont multiples. Qu'il suffise de mentionner :

- ✓ la variété des fluides biologiques dans lesquels la LH est mesurée, ces fluides étant composés de différents constituants susceptibles d'intervenir sur la qualité de la mesure;

- ✓ les différents étalons utilisés dans les différentes trouses immunologiques disponibles sur le marché;
- ✓ les différences de sélectivité de ces trouses à la lumière des anticorps sélectionnés, chaque trousse étant maintenant généralement constituée de deux anticorps anti-LH différents;
- ✓ la microhétérogénéité existant au sein même de la molécule comme source de variation, hétérogénéité située à même la chaîne peptidique primaire et/ou dans les chaînes d'oligosaccharides.

En fonction d'une multitude de facteurs, la LH peut donc exister sous plusieurs formes. Il semble que l'hétérogénéité entachant la chaîne peptidique exercerait une influence plus grande sur l'épitope, ce dernier étant plus tributaire des acides aminés que des oligosaccharides pour sa liaison au récepteur. Par contre, l'hétérogénéité conférée par les sucres serait associée très étroitement à la bioactivité *in vivo* de la molécule (Jeffcoate, 1993).

Ainsi, même si au sein de chacune des espèces persiste une bonne conservation de la séquence en acides aminés dans les sous-unités α et β de la LH, un certain degré d'hétérogénéité peut cependant exister dans les séquences N-terminales des sous-unités α et β , de même qu'en C-terminal sur la sous-unité β (Wilson, Leigh et Chapman, 1990; Pigny et al., 1992) et ce, sans oublier l'hétérogénéité conférée par les oligosaccharides. En raison de cette hétérogénéité, la sous-unité β serait donc formée de structures quelque peu différentes, conférant à cette chaîne la spécificité de l'hormone ainsi que les activités immunologiques et biologiques qui lui sont propres (Dufau et Veldhuius, 1987).

La distribution des différents isoformes pourrait varier en fonction des conditions hormonales (à titre d'exemple, les différents stades du cycle menstruel), en fonction de l'âge (puberté vs adulte) et du sexe de la personne. C'est à l'hypophyse que reviendrait le rôle de régulariser la quantité et l'activité biologique des différents isoformes dans le but d'exercer un contrôle précis sur l'activité gonadique, et c'est en grande partie aux hydrates de carbone que serait due cette microhétérogénéité particulière (Stanton et al., 1993).

Il existerait aussi une variante génétique connue de la sous-unité α , qui serait modifiée en position N-terminale. Cette particularité affecterait 25% de la population sous sa forme hétérozygote et, ce qui est cliniquement très important (notamment), aurait pour effet de diminuer l'immunoactivité de la LH envers ses anticorps respectifs. De 1 à 6% des porteurs de cette modification génétique seraient toutefois homozygotes, donnant dans ce dernier cas une LH apparemment dotée d'une bioactivité normale mais, par contre, totalement indécélable par les systèmes immunologiques actuels (Pettersson et Söderholm, 1991).

Mentionnons enfin qu'une protéolyse de la LH hypophysaire demeure possible entre les résidus 46 et 49 lors du métabolisme post-sécrétoire, laquelle engendrerait la formation de fragments dont les principaux émaneraient de la sous-unité β et seraient excrétés dans l'urine. (Jeffcoate, 1993).

S'impose donc l'importance des « faux-négatifs » lors de la quantification des molécules de LH dans un système immunologique basé sur des anticorps dirigés contre la molécule intacte. On se doit de demeurer vigilant envers tous les événements post-sécrétoires possibles, qu'ils découlent d'une dissociation de l'hétérodimère, d'une protéolyse de la molécule, d'une perte progressive en oligosaccharides ou d'un changement dans la chaîne primaire. Tout cela sans oublier la nature de la matrice d'extraction, les variances génétiques, l'existence possible de réactions croisées avec les autres glycoprotéines et, bien sûr, la présence éventuelle de nombreux isoformes.

2.2.1.2 La configuration de l'hormone

Les sous-unités α et β sont codées par des gènes différents, impliquant donc une synthèse différenciée au niveau ribosomique. À leur arrivée dans le réticulum endoplasmique, les sous-unités α s'enrichissent de deux séries d'oligosaccharides N-liées aux arginines en position 52 et 78, alors que les sous-unités β n'en reçoivent qu'une seule au niveau de leur arginine positionnée en 30.

Grâce à une certaine configuration conférée par les ponts disulfures des nombreuses cystéines, l'hétérodimérisation se produit alors, les deux sous-unités se combinant par des liens non-covalents. C'est également à ce niveau réticulé que semble s'initier l'arborisation des différentes chaînes oligosaccharidiques par le retrait orchestré de molécules de glucose et de mannose de manière à façonner un pentamère commun de sucres. Les premiers sucres de ces chaînes osidiques sont représentés par deux molécules de N-acétylglucosamines liées aux arginines, suivies de trois molécules de mannose (Green, Boime et Baenziger, 1986; Dufau et Veldhuis, 1987; Pigny et al., 1992; Storrington, 1992; Dharmesh et Baenziger, 1993; Schwartz, 1995).

Cependant, ce n'est qu'une fois rendues dans l'appareil de Golgi que se produisent les étapes finales de la fabrication moléculaire où, grâce à la complicité d'une multitude d'enzymes, les chaînes sucrées sont enrichies de groupements sulfatés et sialisés, conduisant ainsi à la formation de structures pentamériques biantennées d'oligosaccharides (voir Figure 1 ci-dessous). C'est également dans l'appareil de Golgi qu'intervient la majorité des modifications responsables de la microhétérogénéité hormonale (Green et Baenzinger, 1988; Pigny et al., 1992). Toutefois, il ne faut pas perdre de vue le rôle principal des chaînes osidiques qui est de permettre le maintien de l'hormone dans une configuration biologiquement active.

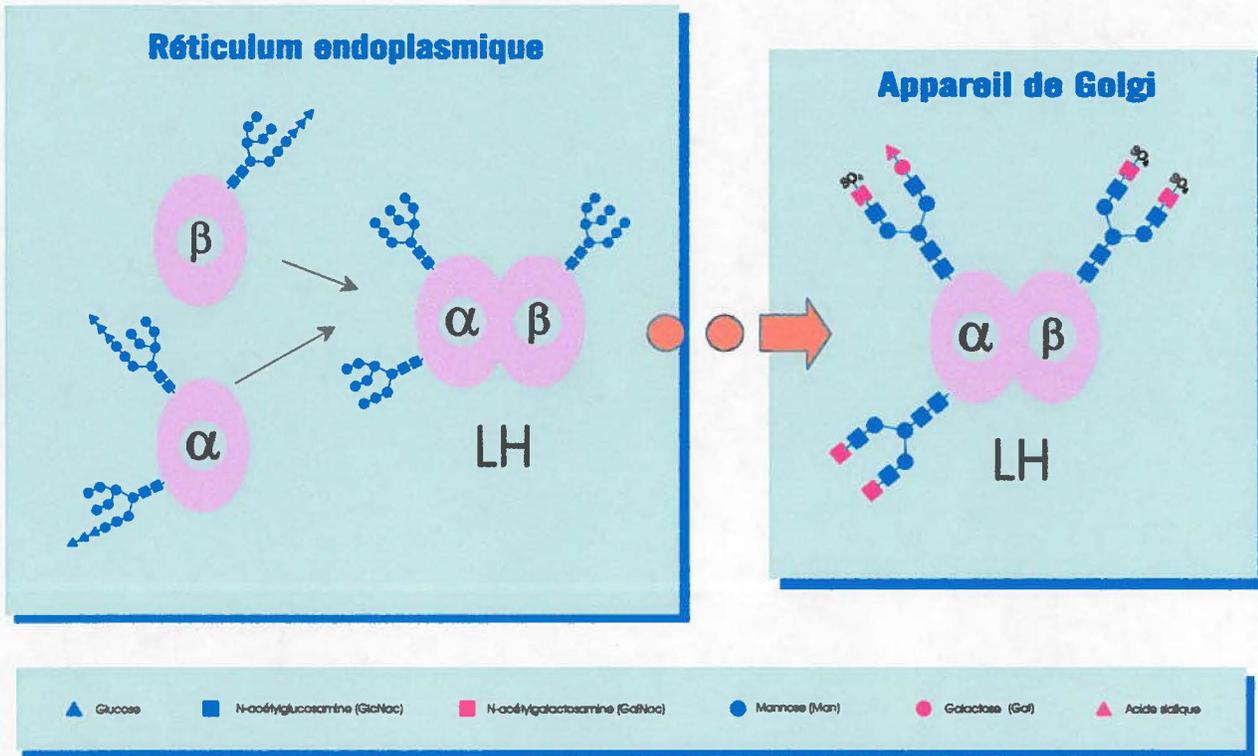


Figure 1. Représentation schématisée des transformations opérées à la molécule de LH au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

Sans être directement impliquée dans sa liaison comme telle, la reconnaissance du récepteur sensible à la LH est attribuable à la sous-unité β . C'est en effet la chaîne α qui semble interagir directement dans la liaison hormone-récepteur, la sous-unité β donnant à la sous-unité α une certaine configuration afin qu'elle puisse épouser adéquatement le récepteur qui lui est spécifique (Pigny et al., 1992). Ainsi, la spécificité de l'hormone se trouve conférée par la sous-unité β , et ce particulièrement dans la région incluant les cystéines en position 10 – 12.

2.2.1.3 La glycosylation

Le plus souvent les isoformes possèdent une séquence identique en acides aminés, la source principale de variations se situant plutôt au niveau de leurs chaînes oligosaccharidiques. Cependant, certaines sources d'hétérogénéité peuvent quand même exister dans la séquence de leurs acides aminés, principalement dans la région N-terminale des sous-unités α et β et/ou au niveau de la région C-terminale de la sous-unité β (Stanton et al., 1993).

L'hétérogénéité conférée par les sucres retient toutefois davantage l'attention des chercheurs. Les différences entre les isoformes se situeraient surtout au niveau des structures oligosaccharidiques, lesquelles représentent 20 à 40% de la masse moléculaire de l'hormone. Presque toutes les molécules de LH peuvent ainsi s'offrir une composition différente d'oligosaccharides liés aux asparagines, se conférant ainsi une certaine hétérogénéité, souvent responsable de leur distribution sérique disparate (Wilson, Leigh et Chapman, 1990; Wayne et al., 1991; Wide et Naessén, 1994). Cette disparité découle du fait que chaque glycoforme possède une charge nette qui lui est propre, fonction de la présence ou non de groupements sulfatés ou de molécules d'acide sialique ($\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$) en position terminale de la chaîne des oligosaccharides.

Autrement dit, les différences retrouvées au sein de ces isohormones seraient le plus souvent attribuables à la qualité des oligosaccharides situés aux extrémités distales des chaînes sucrées de formes pentamériques biantennées (Jeffcoate, 1993; Van Ginkel et Loeber, 1985). En résumé, une bonne part de la microhétérogénéité de la LH serait liée aux sucres terminaux, lesquels sont capables de modifier la charge de la molécule, plus précisément le sulfate N-acétylgalactosamine et l'acide N-acétylneuraminique, les autres composantes de la chaîne d'oligosaccharides de la LH étant des sucres neutres (Gandar et Collin, 1994). Ainsi, les patrons de glycosylation moduleraient l'expression variable des domaines antigéniques à la surface des hétérodimères dérivés de l'hypophyse.

Il faut souligner que la glycolysation de la sous-unité α semble bien importante pour conférer la bioactivité hormonale, cette sous-unité se liant aux récepteurs. La littérature laisse même croire que les chaînes osidiques interviendraient dans le couplage récepteur - adénylcyclase. La qualité des chaînes oligosaccharidiques pourrait donc affecter directement la bioactivité de la LH. Pour certains, la glycosylation pourrait représenter un des mécanismes d'adaptation de l'hypophyse lui permettant de répondre aux différents stimuli extérieurs (Pigny et al., 1992).

Bien que nous reviendrons ultérieurement sur cette notion, mentionnons ici un autre point important touchant la glycosylation : des études comparatives sur les glycoprotéines intactes et déglycosylées ont démontré que les hydrates de carbone semblent influencer les propriétés physico-chimiques des molécules, notamment en affectant la solubilité de la LH (Mitchell et al., 1995b); les déglycosylées étant plus solubles, donc d'élimination plus rapide de la circulation sanguine. Fonctionnellement, une élimination accélérée correspond à une demi-vie plus courte, une telle demi-vie moléculaire étant associée à un potentiel biologique moindre.

2.2.1.3.1 La nature des sucres

Les sucres retrouvés sur les deux chaînes d'acides aminés de la LH sont le mannose (Man), le galactose (Gal), le fucose, le glucosamine, le galactosamine, le N-acétylglucosamine (GlcNac), le N-acétylgalactosamine (GalNac) et l'acide sialique (NeuNac). Ces différents oligosaccharides sont impliqués dans la transduction du signal hormonal. La désialisation de la molécule empêche en effet le couplage à l'adényl cyclase, affectant par le fait même la capacité de production de l'AMPc et, par voie de conséquence, la stéroïdogénèse. Par contre, cette même désialisation entraîne une plus grande affinité de la molécule pour son récepteur (Dufau et Veldhuis, 1987). Les variations multiples dans la teneur en sucres peuvent donc être considérées comme une indication du potentiel des variations considérables qui peuvent avoir lieu lors du modelage post-translational de l'hormone (Green, Boime et Baenziger, 1986). Nous reviendrons sur ce point et avec plus de précision.

La présence de liens α -2,3 et α -2,6 au niveau de l'acide sialique indique que les cellules gonadotropes ont la capacité d'ajouter des molécules d'acide sialique aux structures S - N (chaîne d'oligosaccharides contenant un groupement sulfaté et une molécule d'acide sialique) soit en liaison α -2,3 ou bien α -2,6. Ce potentiel dépend toutefois des influences découlant de la présence des groupements sulfatés attachés aux N-acétylgalactosamines. Effectivement, l'ajout prioritaire de tels groupements sulfatés détermine le type de liaisons privilégiées par l'acide sialique (α -2,3 ou α -2,6) dans sa liaison subséquente à la molécule de galactose (Green et Baenziger, 1988). Les deux types de branchement de l'acide sialique (α -2,3 et α -2,6) peuvent donc se retrouver sur les oligosaccharides sialisés; précisons que l'hétérogénéité ainsi conférée ne se rencontre pas sur la molécule de hCG; cette hormone contenant exclusivement des acides sialiques en position α -2,3 (Green, Boime et Baenziger, 1986).

Ainsi, même si les hormones hypophysaires ont en commun une sous-unité α , elles comportent en arborisation une série d'oligosaccharides qui sont liés à un ASN. Ces oligosaccharides peuvent alors différer dans leurs structures puisqu'ils sont constitués dans des proportions variables de sucres soit neutres, soit sialisés, soit sulfatés ou soit sialisés/sulfatés (Green, Boime et Baenziger, 1986).

2.2.1.3.2 L'arrangement des sucres

2.2.1.3.2.1 La structure pentamérique biantennée

Tous les sucres retrouvés sur la LH ont une structure pentamérique commune qui est structurellement biantennée. Cette arborisation particulière est constituée à la base de deux molécules de N-acétylglucosamine (GlcNAc) liées entre elles en position 1 - 4, suivies d'une molécule de mannose (Man) initiant la structure biantennée, le tout suivi par un attachement à deux autres molécules de mannose, formant ainsi un ramification globale de cinq molécules, d'où son appellation de pentamère. C'est aux deux mannoses distaux que viennent se greffer les autres sucres, donnant par ce fait naissance aux divers isoformes de la LH (Pigny et al., 1992). Ainsi, les isoformes de la LH sont caractérisés par la présence de diverses chaînes d'oligosaccharides dont les cinq premiers éléments font partie d'une structure commune. Les variations entre les isoformes se situent donc plus particulièrement au sommet des chaînes, où viennent s'ajouter, et dans l'ordre, les molécules de N-acétylglucosamine, de N-acétylgalactosamine (GalNAc) ou de galactose (Gal), auxquelles sont parfois reliés des groupements sulfatés (SO_4) ou des molécules d'acide sialique (NeuNAc). Donc, les groupements sulfatés sont liés aux GalNAc terminaux de certaines chaînes et les acides sialiques aux galactoses (Green et Baenziger, 1988). Il existe donc une possibilité minimale de douze différentes branches d'oligosaccharides (Stanton et al., 1993).

2.2.1.3.2.2 La structure distale spécifique

Les oligosaccharides anioniques, ceux dotés de groupements sulfatés et/ou molécules d'acide sialique en position terminale, prédominent chez la plupart des glycoprotéines, c'est-à-dire dans une proportion supérieure à 70% du total des oligosaccharides branchés à un ASN (Green, Boime et Baenziger, 1986). Quant aux isoformes de la LH, ils sont généralement composés d'une combinaison de sucres qui sont soit neutres (dépourvus de groupements sulfatés et de molécules d'acide sialique), soit sialisés, soit sulfatés (S_1 ou S_2 selon la présence d'un ou deux sulfates), ou soit sulfatés/sialisés.

Sur une même chaîne peuvent ainsi se retrouver un ou deux groupements sulfatés et une à deux molécules d'acide sialique. La LH peut donc contenir un groupement sulfaté et une molécule d'acide sialique sur la même structure (oligosaccharide S-N). Pour la LH, ce sont ces chaînes à la fois sulfatées et sialisées que l'on retrouve en plus grande proportion, et ce contrairement à la FSH où l'acide sialique se fait prédominante. De plus, seule la structure pentamérique biantennée se rencontre chez la LH, contrairement à d'autres hormones qui démontrent parfois une structure à trois embranchements (Green et Baenziger, 1988; Stanton et al., 1995). En effet, la LH ne porte aucune arborisation à trois embranchements, contrairement à la FSH, laquelle contient des oligosaccharides trisialisés (Green, Boime et Baenziger, 1986).

De plus, les oligosaccharides branchés sur la LH et la FSH diffèrent dans leurs proportions relatives en groupements sulfatés et en molécules d'acide sialique : la LH contient surtout des groupements sulfatés, même si les molécules d'acide sialique s'y retrouvent en quantité significative, alors que la FSH possède beaucoup plus de molécules d'acide sialique que de groupements sulfatés (Green et al., 1986).

Enfin, et ce de façon générale, les chaînes ayant un seul groupement sulfaté prédominent sur la sous-unité α de la LH, tandis que les chaînes à deux groupements sulfatés seraient plus abondantes sur la sous-unité β ; les oligosaccharides neutres seraient, quant à eux, plus particulièrement présents au niveau de la sous-unité α (Green, Boime et Baenziger, 1986; Green et Baenziger, 1988).

Tous ces arrangements uniques et complexes témoignent donc du fait qu'au moment de leurs branchements les oligosaccharides se retrouvent, à chaque étape de la synthèse, sous l'influence de mécanismes de régulation qui se veulent endocriniens, ce qui nous oblige donc à croire à une diversité impressionnante d'isoformes de la LH.

2.2.1.3.3 Le rôle des oligosaccharides

L'importance fonctionnelle des différents sucres arborisés peut se percevoir à plusieurs niveaux. Qu'il suffise de mentionner :

- ✓ celui de l'épuration métabolique;
- ✓ celui du contrôle de la réponse hormonale;
- ✓ celui de la modulation du potentiel de l'hormone;
- ✓ celui du triage intracellulaire des hormones en granules sécrétoires.

La variété de structures arborescentes issues de la combinaison des diverses modifications anioniques est grande et fournit des informations fonctionnelles importantes sur la bioactivité de l'hormone (Green, Boime et Baenziger, 1986).

Le type et la proportion des isoformes peuvent ainsi varier selon la source de l'échantillon considéré. En effet, il existerait des différences dans la LH, selon que les échantillons :

- ✓ proviennent du plasma, du sérum ou de l'urine;
- ✓ soient obtenus sous des conditions pathophysiologiques variables;
- ✓ contiennent des hormones sécrétées naturellement ou obtenues génétiquement par synthèses induites à partir d'ADNr issus de diverses lignées de cellules (Storring, 1992).

En général, la charge conférée aux gonadotropines par les radicaux acides attachés au groupe terminal des oligosaccharides influence le potentiel biologique de l'hormone. Les structures basiques (celles les moins sialisées) sécrétées surtout lors de la période féconde (de la puberté à la ménopause) possèdent un potentiel biologique plus grand lorsque mesurées par titrations *in vitro*, en dépit du fait que la demi-vie de ces hormones soit moindre. Pour leur part, les structures acides sont moins bioactives mais disposent d'une demi-vie accrue, possédant ainsi un potentiel biologique plus grand lors de titrations *in vivo* où, par définition, elles demeurent plus longtemps en circulation.

Ainsi, selon les différents stades physiologiques, les structures glycosylées seraient modifiées, ce qui sûrement apparaît de première importance pour l'expression du potentiel biologique de l'hormone (Wilson, Leigh et Chapman, 1990; Pigny et al., 1992).

De plus, et prenant en compte les formes glycosylées constituant le patrimoine bioactif, les structures déglycosylées pourraient ainsi jouir d'une fonction anti-hormonale, antagonisant l'hormone glycosylée par compétition pour le même récepteur.

Sans pour autant induire de réponses hormonales adéquates, d'où une stéroïdogénèse plus faible, il est connu qu'une liaison hormone-récepteur est plus forte avec un ligand déglycosylé qu'avec un ligand normalement glycosylé (Dufau et Veldhuis, 1987; Green et Baenziger, 1988; Revol et al., 1994). Il semble de plus que la déglycosylation affecterait davantage la capacité de production d'AMPc que la stéroïdogénèse; démonstration faite par titration biologique par Hutchinson et collaborateurs (1988) dans un étude examinant la somme des effets, tant ceux inhibiteurs que stimulateurs de la LH.

2.2.1.4 La bioactivité et le potentiel biologique

Les différences dans les niveaux de bioactivité découlent principalement des différences dans le contenu en oligosaccharides arborisés (Tommaselli et al., 1995). L'activité biologique *in vivo* est en effet soumise aux caractéristiques de la glycosylation (Jeffcoate, 1993), et en raison des différents glycoformes, les propriétés immunologiques (I) de la LH ne correspondent pas toujours aux propriétés biologiques (B) de l'hormone. Dans la circulation sanguine et de manière générale, les isoformes acides possèdent une demi-vie plus longue mais sont moins bioactifs, alors que les isoformes basiques possèdent une demi-vie plus courte tout en étant plus bioactifs (Haavisto, Simberg et Huhtaniemi, 1990; Veldhuis et Dufau, 1993). La LH basique possède donc un index B/I plus élevé, ce qui découle fort probablement des différences retrouvées dans la teneur relative en molécules d'acide sialique et en groupements sulfatés, ces deux derniers étant négativement chargés en position terminale de la chaîne osidique (Ding et Huhtaniemi, 1991). Comme mentionné, il semble que ce soit les stéroïdes sexuels qui agissent de manière concertée sur l'hypophyse dans le but d'influencer les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles de la LH, ce qui ne va pas sans se répercuter sur le potentiel biologique de la LH au niveau des cellules-cibles.

Ainsi, la teneur totale en LH et en FSH n'augmenterait pas au cours de la puberté mais, possiblement, uniquement ses formes les plus basiques : celles à plus forte bioactivité s'accumuleraient alors que les formes les plus acides, celles les moins bioactives, diminueraient (Green, Boime et Baenziger, 1986).

Cependant, avec l'âge, la bioactivité de la LH diminuerait alors que son immunoractivité demeurerait la même, entraînant ainsi une diminution du rapport B/I. Cette variation liée à l'âge chronologique ferait que la proportion des glycoformes acides sialysés augmente avec le vieillissement d'où une diminution de l'épuration, ce qui sera explicité ultérieurement dans ce travail (Mitchell et al., 1995c).

Dans cet optique, l'observation d'une augmentation de LH bioactive en période pubertaire, plus marquée que l'augmentation en LH immunologique, demeure des plus intéressantes.

Ainsi, et comparativement à cette dernière, la LH bioactive serait un meilleur reflet :

- ✓ de l'action physiologique;
- ✓ de la maturation gonadique contemporaine, et
- ✓ du patron de sécrétion des hormones stéroïdiennes.

Il faudrait mettre ces observations en relation avec le rôle important joué par les différents isoformes au niveau de la reproduction. Leurs formes acides seraient requises pour la croissance et le maintien des fonctions des organes reproducteurs; quant aux formes basiques, par leur demi-vie plus courte dans le torrent circulatoire, elles confèreraient un stimulus optimal à certains événements dynamiques, telle l'ovulation avec son pic de LH.

Ainsi, et en résumé, les isoformes acides participeraient à la croissance et au développement des structures gonadiques, alors que les isoformes basiques initieraient les changements rapides dans la stéroïdogénèse chez l'homme et au moment de l'ovulation chez la femme (Beitins et Padmanabhan, 1991).

2.2.1.5 La demi-vie et l'épuration

La LH, dans sa conformation première, est rapidement éliminée de la circulation sanguine par un récepteur hépatique reconnaissant spécifiquement les oligosaccharides sulfatés. L'épuration est encore plus rapide si on enlève ledit groupement sulfaté, exposant ainsi la molécule de GalNAc β -1,4 liée. Ceci découlerait de la reconnaissance particulière des récepteurs hépatocytaires spécifiques aux molécules Gal et GalNAc, réduisant ainsi davantage le potentiel biologique *in vivo* de l'hormone désulfatée. Par ailleurs, les oligosaccharides dotés d'une glycosylation terminale caractérisée par la présence d'une molécule d'acide sialique ne sont reconnus ni par les récepteurs hépatiques spécifiques aux oligosaccharides sulfatés de l'hormone première ni par les récepteurs Gal/GalNAc, permettant alors à l'hormone une augmentation de sa demi-vie de 4 à 5 fois comparativement à l'hormone première (Wilson, Leigh et Chapman, 1990; Dharmesh et Baenziger, 1993).

Un contrôle de la GalNActransférase et de la sulfotransférase permettrait donc un ajustement aux changements en réponse à des fluctuations des niveaux de LH. Le taux de GalNAc-SO₄ peut donc demeurer constant pour assurer une épuration rapide de l'hormone (Dharmesh et Baenziger, 1993).

De plus, les niveaux de GalNAc et de sulfotransférase seraient contrôlés par les œstrogènes, tout comme la LH d'ailleurs. Donc, la portion sulfatée s'avérerait relativement constante selon la quantité de LH : si la LH augmente, sa portion sulfatée fera de même, favorisant ainsi l'épuration et permettant un retour facile au niveau basal (Dharmesh et Baenziger, 1993). À titre d'exemple, lors du pic ovulatoire lutropique, il se produit un changement dans la proportion des oligosaccharides de la LH se terminant par un groupement sulfaté par opposition à ceux se terminant par une molécule d'acide sialique. De ce fait, la demi-vie de l'hormone diminue alors que la bioactivité augmente, cela en raison d'une proportion plus grande de glycoformes sulfatées (Darmesh et Baenziger, 1993).

En ce qui concerne l'acide sialique, avec la désialylation on assisterait à une augmentation de la bioactivité lutropinémique parallèlement à une diminution de son potentiel biologique *in vivo*; il en va ainsi puisque l'absence de l'acide sialique écourte la demi-vie de l'hormone en circulation, les isoformes sans acide sialique étant effectivement rapidement épurés par des récepteurs sensibles aux molécules de mannose fixés aux hépatocytes et aux cellules des tubules rénaux proximaux (Beitins et Padmanabhan, 1991).

2.2.1.6 La reconnaissance immunologique

L'hétérogénéité des hormones peptidiques dans le sérum représente un phénomène bien connu étayé par une littérature bien documentée et ce, depuis les trente dernières années, date des premiers balbutiements des titrations immunologiques. Il n'y a donc rien de surprenant à voir s'installer depuis quelques années un questionnement sur la validité analytique et la signification clinique de ces méthodes de titrations (Jeffcoate, 1993).

La spécificité des titrations immunométriques dépend de l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé. L'épitope pour la LH peut être soit un ou des acides aminés ou soit une ou des structures oligosaccharidiques. L'anticorps polyclonal reconnaît toutes (ou presque) les formes circulantes de LH, alors que les systèmes basés sur l'utilisation d'un couple d'anticorps monoclonaux (système dit "sandwich") reconnaissent nécessairement deux épitopes spécifiques.

La Figure 2 ci-dessous est adaptée des travaux de Pettersson et Södrholm (1991) et se veut une représentation schématique d'épitopes reconnus par autant d'anticorps monoclonaux examinés par cette équipe finlandaise. Cette figure démontre essentiellement que l'établissement d'un système "sandwich" à base d'anticorps monoclonaux nécessite un couple d'anticorps dont les paratopes ne reconnaissent pas les mêmes épitopes ni même une partie de ces derniers.

À titre d'exemple, un système analytique pourrait contenir un anticorps reconnaissant le paratope # 1 et un autre le paratope # 3; nous aurions alors un système "beta/beta" basé totalement sur la reconnaissance de la sous-unité β . Il en irait de même si les anticorps utilisés reconnaissaient respectivement les paratopes # 1 et 6 localisés sur la sous-unité β . Si les épitopes reconnus par le système analytique sont ceux désignés par les numéros 1 et 4, la présence des deux sous-unités (α et β) devient essentielle; les molécules dissociées ne pourront être reconnues par un tel système analytique. Il en serait ainsi avec la reconnaissance des épitopes # 1 et # 8, ou # 9, ou # 10, ou # 11.

Il devient évident qu'un système analytique basé sur la reconnaissance des épitopes # 10 et # 11 serait des plus inefficaces, car incapable de distinguer la LH de la FSH ou de la TSH ou du hCG. Mentionnons enfin que l'utilisation d'anticorps reconnaissant des épitopes trop rapprochés sur la molécules (ex. # 1 et # 2, # 2 et # 3, # 3 et # 4, # 5 et # 6 ou # 7, etc.) ne pourrait fonctionner, les paratopes ne pouvant rejoindre facilement leurs épitopes respectifs.



Figure 2. Présentation schématique des inter-relations entre onze différents anticorps monoclonaux tous dirigés contre la LH. Chacune des figures ovales représente l'épitope reconnu par un de ces onze anticorps monoclonaux. La couleur de ces ovales indique si l'épitope est continu sur la sous-unité β (fuschia) ou sur la sous-unité α (brun), ou bien discontinu, se prolongeant sur les deux sous-unités de la LH (bleu). Les X indiquent l'incompatibilité des deux anticorps qu'ils relient.

Les anticorps polyclonaux semblent dans l'incapacité de reconnaître ni le détail de la structure des sucres ni la séquence en acides aminés. Cependant, une étude conduite par Tommaselli et collaborateurs (1995) préconise l'utilisation de troussees basées sur des anticorps polyclonaux lorsque l'utilisateur croit qu'il y a eu atteinte à l'intégrité de la chaîne glycosidique de l'hormone. En effet, la liaison épitope-paratope est plus sensible, voire plus spécifique, lorsqu'un anticorps monoclonal est utilisé, ce dernier étant reconnu pour sa vulnérabilité à une désialylation ou à une déglycosylation.

Les travaux de Storrington (1992) avaient déjà documenté le fait que les changements entraînés par une déglycosylation sur l'immunoréactivité étaient moindres si le système analytique utilisait des anticorps polyclonaux plutôt que monoclonaux. Ainsi, l'utilisation d'anticorps polyclonaux pourrait permettre de mieux visualiser les différentes isohormones induites par les stéroïdes (Veldhuis et Dufau, 1993).

La glycosylation jouerait donc un rôle certain sur les caractéristiques immunologiques. Il est admis par contre que la LH se doit d'être intensément déglycosylée avant que cela se répercute sur ses propriétés immunologiques; toutefois, il ne faudrait pas sous-estimer l'importance d'une déglycosylation sur la conformation tridimensionnelle, sur la dimension spatiale de l'épitope, donc sur l'antigénécité de l'hormone (Jeffcoate, 1993).

Certains anticorps semblent impuissants à reconnaître certaines espèces de LH qui, pourtant, sont reconnues par des approches biologiques, rendant ainsi inefficaces certaines trousse mises en marché pour la mesure des isoformes de la LH (Revol et al., 1994). De plus, selon certains, il vaudrait mieux utiliser une trousse dont l'anticorps est dirigé contre un épitope situé sur la sous-unité β , car certaines sous-évaluations quantitatives de la LH seraient attribuables à une incapacité à mesurer l'hormone suite à une dissociation de ses sous-unités α et β . Ces sous-évaluations s'expliqueraient également par l'existence de fragments de LH, surtout en milieu urinaire, où une partie plus ou moins importante de l'épitope serait disloquée, empêchant ainsi la reconnaissance de la molécule par l'anticorps. On se doit également de souligner l'existence de variantes autosomales dominantes pour la LH, lesquelles conduisent à des valeurs faussement négatives lors de l'immunotitration. Dans le but d'optimiser la quantification de la LH par immunotitration, certains ont proposé l'utilisation de trousse mixtes, où la capture serait effectuée au moyen d'un anticorps polyclonal susceptible de reconnaître une plus grande quantité d'isoformes, et où l'identification serait effectuée au moyen d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la sous-unité β (Martin-Du-Pan, Horak et Bischof, 1994).

En résumé :

- ✓ l'hétérogénéité moléculaire peut provenir de deux sources non mutuellement exclusives: variations dans la chaîne peptidique et variations dans l'arborisation glycosidique;
- ✓ l'immunotitration dépend, entre autres, de la spécificité du paratope de l'anticorps utilisé;
- ✓ pour les glycoprotéines, la spécificité de l'épitope dépend largement de la séquence en acides aminés et moins des structures oligosaccharidiques;
- ✓ les immunotitrations sont plus aveugles dans les formes et les proportions des glycoformes de LH, donc difficilement capables de discrimination moléculaire et susceptible de sur-évaluation et/ou de sous-évaluation.

2.3 La physiologie de la LH

2.3.1 Les relations gonades - tandem hypothalamo-hypophysaire

L'hypophyse possède le potentiel de sécréter différentes espèces de LH, chacune dotée d'une bioactivité (**B**) et d'une immunoréactivité (**I**) qui lui est particulière. Ces différentes espèces de LH peuvent être influencées par des changements du milieu hormonal; ainsi, l'effet des gonadotropines sur la stéroïdogénèse ne dépend pas seulement de la quantité de ces dernières mais également de leur potentiel biologique, donc de leur qualité (Hutchison, 1988; Dahl et al., 1992).

Chez l'homme, les androgènes endogènes modulent la sécrétion de LH bioactive au moyen d'un mécanisme agissant soit sur l'hypothalamus, par changements de la fréquence ou de l'amplitude des GnRH, soit sur l'hypophyse, en modifiant l'action des GnRH sur les cellules gonadotrophes (Veldhuis et Dufau, 1993; Hileman et al., 1994).

La fréquence des pulsations des GnRHs perçues au niveau de l'hypophyse exerce un effet déterminant sur les niveaux d'ARNm des sous-unités gonadotropiques; une diminution des pulsations de GnRH étant associée à un affaissement des concentrations en ARNm sous-tendant tant la LH $_{\alpha}$ que la LH $_{\beta}$ (Schwartz, 1995). Cependant, les GnRHs agiraient seulement sur la synthèse peptidique et la sécrétion. Les gonadolibérines n'agiraient donc pas sur la partie glucidique des LH (Gandar et Collin, 1993).

Ainsi, une hypothèse soutient que les hormones stéroïdiennes agiraient au niveau hypophysaire en influençant les caractères physico-chimiques et les caractéristiques fonctionnelles de la LH, qui se refléteraient par les différences dans les actions biologiques de la LH sur les cellules-cibles.

L'effet des stéroïdes sur l'hypophyse serait donc associé à l'incorporation de résidus spécifiques d'hydrates de carbone et/ou au degré de sulfatation desdits sucres terminaux, le tout à un niveau co- ou post-transductionnel. Modulant ainsi l'arborisation glucosidique des sous-unités, les stéroïdes en régularisent la glycosylation, donc la microhétérogénéité (Ding et Huhtaniemi, 1991; Veldhuis et Dufau, 1993; Wide et Naessén, 1994).

À titre d'exemple, soulignons que la testostérone est reconnue pour sa capacité particulière à augmenter la proportion des glycoformes acides sialysés de la LH au niveau de l'hypophyse (Mitchell et al., 1994a).

Le polymorphisme des hormones glycoprotéiques apparaît ainsi comme un phénomène des plus finement régulés. En fonction des conditions physiopathologiques existantes, l'hypophyse aurait donc le potentiel nécessaire pour moduler tant l'intensité que la qualité du signal parvenant aux organes-cibles :

- ✓ l'intensité du signal par modulation de l'expression des gènes codant pour les sous-unités;
- ✓ la qualité du signal par régulation des modifications post-traductionnelles, dont la glycosylation (Pigny et al., 1992).

La rétroinhibition des androgènes semble se faire directement sur l'hypophyse ou indirectement au niveau de l'hypothalamus. La testostérone agirait directement sur les cellules-cibles en se liant aux récepteurs androgéniques ou, indirectement, en étant préalablement transformée en œstradiol ou en dihydrotestostérone (DHT). À titre d'exemple, lors de l'administration de testostérone ou d'œstradiol, des pertes en LH et en FSH tant immunoréactives que bioactives furent mesurées. L'effet supresseur de la testostérone au niveau de l'hypophyse semble donc largement tributaire de son aromatisation en œstradiol. Il y existerait donc un effet direct de la testostérone comme de l'œstradiol sur l'hypophyse (Bhatnagar et al., 1992; Bagatell, Dahl et Bremner, 1994).

En général, il semble que les androgènes puissent affecter tant la biosynthèse que le largage de la gonadostimuline, tout en exerçant un effet sur les dernières étapes de la glycosylation ou du métabolisme de la LH (Dahl et al., 1992).

2.3.2 Les récepteurs

Les récepteurs sensibles aux hormones stéroïdiennes pourraient résider dans les mêmes cellules du cerveau. Ainsi, il y aurait dans certaines régions du cerveau des cellules dotées de récepteurs œstrogéniques ou androgéniques, alors que d'autres régions cérébrales disposeraient de cellules ayant des récepteurs sensibles tant aux œstrogènes qu'aux androgènes. Existerait donc une possibilité pour l'expression d'actions synergiques entre œstradiols et androgènes (Wood et Newman, 1995).

Des récepteurs de la LH (et du hCG) sont présents au niveau des cellules de Leydig, des cellules interstitielles de la thèque ovarienne, des cellules à maturité de la granuleuse et au niveau des cellules du corps jaune. Ils sont constitués de protéines ancrées dans la membrane plasmique et formés de deux domaines, un extracellulaire hydrophile (N-terminal) et un autre traversant la membrane à sept reprises et se terminant par une courte queue cytoplasmique (C-terminal) (Pallikaros et al., 1995). Le récepteur sensible à la LH fait partie de la famille des récepteurs liés à la protéine G.

En effet, lors de l'association LH-récepteur, il se produit une activation de la protéine liant le GTP (GS) et, subséquentement, stimulation de l'adénylate cyclase, entraînant ainsi une augmentation de la teneur en AMPc, cette dernière activant les protéines kinases qui lui sont dépendantes; en résulte la synthèse et la sécrétion des hormones stéroïdiennes.

2.3.3 Les mécanismes de reconnaissance de la cible

La sous-unité β détient comme fonction reconnue celle de conférer à la sous-unité α les changements nécessaires permettant son interaction avec le site de reconnaissance (LHRc) correspondant. Il découle de ce constat que la sous-unité α possède la plupart des sites de reconnaissance pour l'interaction ligand-récepteur où les oligosaccharides lutropiques apparaissent essentiels à la production du signal transductionnel (Green, Boime et Baenziger, 1986; Dufau et Veldhuis, 1987).

Certaines études prétendent que des régions de la sous-unité α , de concert avec des domaines de la sous-unité β , seraient impliquées dans la reconnaissance des récepteurs; en témoigne le fait que, isolément, chacune des sous-unités de la LH ne peut s'associer aux récepteurs-cibles (Beitins et Padmanabhan, 1991).

Keutmann et ses collaborateurs (1992) proposent un modèle original pour expliquer le mécanisme du couplage. Ils soutiennent que l'interaction hormone-récepteur met en jeu, d'une part le squelette peptidique des sous-unités et, d'autre part, les chaînes glycaniques qui interagissent avec des structures simili-lectines situées au sein ou à proximité du récepteur hormonal. L'interaction lectine-sucres permettrait la micro-aggrégation des récepteurs, étape nécessaire à l'activation de l'adénylcyclase.

D'autres auteurs croient toutefois que les chaînes osidiques interviennent pour maintenir l'hormone dans une conformation biologiquement active (Pigny et al., 1992). Les hormones déglycosylées présentent une affinité excellente, voire supérieure, à celles des hormones non-déglycosylées; ainsi, la déglycosylation de la sous-unité α accroîtrait la liaison de l'hormone à son récepteur sans affecter la recombinaison des sous-unités entre elles. Donc, les chaînes d'hydrates de carbone influenceraient l'affinité, permettant d'augmenter la capacité de reconnaissance *in vitro* de l'hormone par le récepteur. En d'autres mots, les hydrates de carbone n'affecteraient ni la reconnaissance, ni le lien entre l'hormone et le récepteur.

Par contre, la déglycosylation diminuerait la formation de l'AMPc, tout comme elle entraverait la stéroïdogenèse (Green, Boime et Baenziger, 1986; Wilson, Leigh et Chapman, 1990). Plus précisément, la déglycosylation de la sous-unité α préviendrait la transduction du signal hormonal (la production d'AMPc), et ce même en présence des oligosaccharides de la sous-unité β . Par contre, la déglycosylation de la sous-unité β n'affecterait en rien la transduction du message apporté par l'hormone.

De manière générale, dans la circulation sanguine :

- ✓ des enzymes comme la neuraminidase favorise la désialylation;
- ✓ une diminution des sucres entraîne une plus forte épuration mais sans atteinte à la liaison hormone-récepteur;

- ✓ une modification des acides aminés ou de la conformation tridimensionnelle diminue la liaison au récepteur et empêche la transmission du signal de transduction.

Ainsi, la proportion des isoformes qui atteignent les récepteurs déterminerait l'expression finale de la bioactivité (Beitins et Padmanabhan, 1991).

2.4 L'étalonnage

L'étalonnage des hormones peptidiques, de manière générale, demeure assez primaire. En ce qui concerne la LH, soulignons d'entrée de jeu que le simple fait de constituer un étalon à partir d'un pool d'hypophyses, donc d'un nombre indéterminé d'espèces moléculaires de LH, démontre à lui seul l'étendue de la problématique. Ainsi, et comme il est souligné ci-dessous, il ne faut jamais perdre de vue que même parmi les étalons il y aurait plusieurs isoformes de LH (Van Ginkel et Loeber, 1987).

2.4.1 Les premières préparations internationales de référence

Les méthodes utilisées pour l'extraction et la purification de la LH peuvent modifier sérieusement son patron d'hétérogénéité. Lors de la purification de la LH hypophysaire, il se produit une sélection préférentielle d'isoformes plus basiques, lesquels disposent de demi-vies plus courtes. Ceci n'apparaît aucunement souhaitable si, à titre d'exemple, l'on cherche à obtenir un effet maximal sur la liaison de l'anticorps à l'antigène (Jeffcoate, 1993).

Encadrée par la « National Pituitary Agency », maintenant le « National Hormone and Pituitary Program », un groupe d'étude faisant appel à la collaboration de plusieurs autres laboratoires fut mis sur pied pour étudier les relations entre les dosages biologiques (analyses *in vivo*) et immunologiques (analyses *in vitro*) de la LH, et ce peu de temps après la mise au point des titrations radioimmunologiques (RIA) de premières générations (Albert et al., 1968).

En 1968, et encore maintenant, on ne pouvait compter sur une préparation de référence fiable pour le dosage de la LH, et « l'aïeul » des étalons, soit le « **Second International Reference Preparation of human menopausal gonadotropin** » (2^e IRP-hMG), un étalon par définition d'origine urinaire, servit d'étalon primaire pour les essais biologiques (*in vivo*).

L'origine urinaire de ce 2^e IRP-hMG, jumelée à l'épuisement rapide de ses réserves, favorisèrent la préparation d'un deuxième étalon mais, cette fois, d'origine hypophysaire et non urinaire et, de surcroît, disponible en quantités suffisantes : il s'agit de l'étalon baptisé LER-907. Il fut alors mesuré dans des systèmes radioimmunologiques (RIA).

Utilisant comme étalon de référence le 2^e IRP-hMG (d'origine urinaire), le groupe d'étude démontra que le LER-907 (d'origine hypophysaire) donnait des valeurs de LH immunoréactives supérieures à celles obtenues par titration biologique (*in vivo*). Ce même groupe recommanda donc que le LER-907 soit, sur une base temporaire, utilisé pour la seule mesure de la hLH immunoréactive et qu'il ne serve pas à des fins diagnostiques.

Simultanément, de grandes quantités de LER-907 furent acheminées à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS/WHO) qui le rebaptisa WHO 69/104 et l'identifia comme étant la préparation internationale de référence « First human pituitary gonadotropin », soit ce qu'il est convenu d'appeler le 1^{er} IRP-hPG. Bangham et collaborateurs (1973) formèrent alors un groupe international d'étude pour comparer les préparations internationales de référence devenues ainsi disponibles (Tableau II).

L'étalon LER-907 contenait 0,50 mg/ampoule; cependant, sous étiquette WHO 69/104, 88% de sa bioactivité *in vivo* (soit 0,44 vs 0,50 mg/ampoule) et 96% de son immunoréactivité (RIA : 0,48 vs 0,50 mg/ampoule) étaient récupérées.

Comme ce fut le cas lors de l'étude de 1968, une grande disparité entre les valeurs de bioactivité *in vivo* et d'immunoréactivité pour la LH était mise à jour par cet étalon; ainsi, par RIA, chaque ampoule du 1^{er} IRP-hMG semblait contenir en moyenne 29,3 UI/ampoule (Tableau II, troisième colonne) dans des systèmes RIA étalonnés avec l'étalon-parent LER-907, mais tout en s'avérant contenir 4,5 fois plus de matériel, soit une moyenne de 132 UI/ampoule (Tableau II, quatrième colonne) en regard des systèmes RIA étalonnés contre le 2^e IRP-hMG étalon contre lequel le LER-907 avait pourtant été préalablement calibré par titration biologique.

Autrement dit, lorsque le 1^{er} IRP-hMG (WHO 69/104) était comparé au LER-907 duquel il était dérivé, le rapport bioactivité/immunoactivité (B/I) approchait de l'unité ($0,44/0,48$ mg/ampoule = 0,92 ; tableau II, première et deuxième colonnes), alors que ce même 1^{er} IRP-hMG lorsque comparé au 2^e IRP-hMG donnait un rapport B/I de 0,20 (bioactivité = 88% de 30 UI/ampoule du LER-907 = 26,4 UI/ampoule ; immunoréactivité = 132 UI/ampoule).

Ces données semblaient donc indiquer une grande hétérogénéité moléculaire entre les étalons.

| Valeurs du 1 ^{er} IRP-hPG (WHO 69/104) | | | | |
|---|-------------|----------|------------------|------------------------|
| en termes des étalons LER-907 et 2 ^e IRP-hMG | | | | |
| | BIOACTIVITÉ | | IMMUNORÉACTIVITÉ | |
| LAB. | LER-907 | LER-907 | LER-907 | 2 ^e IRP-hMG |
| # | (mg/amp) | (mg/amp) | (UI/amp) | (UI/amp) |
| 1 | 0,45 | 0,56 | 33,6 | 186 |
| 2 | 0,40 | 0,47 | 28,2 | 099 |
| 3 | 0,31 | 0,52 | 31,2 | 135 |
| 4 | | 0,40 | 24,0 | 106 |
| 5 | | 0,49 | 29,4 | 154 |
| 6 | | 0,49 | 29,4 | 131 |
| Moyenne | 0,44 | 0,48 | 29,3 | 132 |
| Récupération | 88% | 96% | 98% | 450% |

Tableau II. Teneurs en LH du 1^{er} IRP-hPG (WHO 69/104) en regard des autres étalons disponibles (Bangham et al., 1973) 1: les laboratoires ayant mesuré la bioactivité sont différents de ceux ayant mesuré l'immunoréactivité de la LH ; 2: le LER-907 contient 0.50 mg/ampoule ; 3: le LER-907 contient 60 UI/mg (30 UI/ampoule) tel que mesuré par des titrations biologiques *in vivo* en regard du 2^e IRP-hMG selon une évaluation révisée en 1978 par la National Pituitary Agency; 4: moyenne pondérée pour le nombre d'analyses.

Le groupe de chercheurs mesura également par RIA l'immunoréactivité d'un autre lot, le WHO 69/176, un pool plasmatique obtenu de femmes postménopausées, nouvel étalon mesuré contre deux différents étalons préparés pour titrations biologiques (Tableau III).

En dépit de corrélations intéressantes, deux phénomènes intéressants se dégagèrent de cette étude :

- ✓ la concentration sérique de LH étalonnée contre l'étalon urinaire 2^e IRP-hMG (Tableau III, colonne de droite) s'avéra être de quatre à cinq fois plus élevée que lorsqu'elle était étalonnée contre le 1^{er} IRP-hPG (tableau III, colonne du centre) ce qui, pour les chercheurs n'avait rien de surprenant pour de telles préparations ;

- ✓ la concentration de LH sérique, mesurée tant en ng/ml d'un étalon qu'en mUI/ml de l'autre, variait jusqu'à trois cent pour cent (300%).

| Labo | Immunoréactivité de la LH | | |
|---------|-------------------------------------|------------------------|--------|
| | 1 ^e IRP-hPG (WHO 69/104) | 2 ^e IRP-hMG | |
| # | ng/mL | mUI/mL | mUI/mL |
| 1 | 207 | 12.4 | 65 |
| 2 | 276 | 16.6 | 65 |
| 3 | 389 | 23.3 | 114 |
| 4 | 525 | 31.5 | 115 |
| 5 | 472 | 28.3 | 174 |
| 6 | 155 | 9.3 | 45 |
| Moyenne | 337 | 20.2 | 96 |

Tableau III. Valeurs de la LH immunoréactive (RIA) de la préparation de référence WHO 69/176 constituée d'un pool de hLH plasmatiques obtenues de femmes postménopausées et telles que mesurées par six laboratoires indépendants (adapté de Bangham et al., 1973).

Sur la base de ces observations, l'OMS attribua au 1^{er} IRP-hPG une activité de 50 UI/mg lequel, en 1978, fut subséquemment recalibré à 60 UI/mg par la National Pituitary Agency. L'OMS recommanda que cette préparation soit utilisée comme étalon de référence lors des titrations biologiques.

L'OMS conclut par contre que cette préparation était inadéquate lorsque utilisée pour fins de comparaison inter-laboratoires par techniques radioimmunologiques à l'exception de systèmes de titration reconnus et déclarés spécifiques pour une seule hormone.

Toutefois, la préparation apparentée LER-907 est demeurée longtemps l'étalon de référence distribué par le National Institut of Health (NIH), étalon doté d'un potentiel immunologique évalué à 277 UI/mg (Rosenberg, 1979)

La problématique, toujours actuelle, de l'étalonnage des titrations radio-immunologiques pour la LH est encore et toujours exactement celle décrite au cours de ces années : les LH-étalons utilisées présentent des bioactivités et des immunoréactivités différentes, les quantités plasmatiques de LH et les rapports B/I variant selon les systèmes analytiques utilisés. De plus, il y a peu de concordance inter-laboratoires entre les valeurs «apparentes » de la LH sérique.

Pourtant, persiste toujours une croyance généralisée voulant que l'expression des concentrations sériques de LH en fonction d'unités IRP permette ces comparaisons inter-laboratoires. Dans cette optique, le programme de contrôle de la qualité du College of American Pathologists, quoique louable sous plusieurs chefs, demeure discutable par plusieurs lorsqu'il se veut garant de la validité des analyses.

2.4.2 La titration biologique in vitro

Une véritable révolution dans l'univers de la mesure de la LH se produisit avec la mise au point de titrations biologiques *in vitro* par Dufau et ses collaborateurs (1974, 1976) et le groupe dirigé par Van Damme (Van Damme et al., 1977). Il s'agit de systèmes analytiques très sensibles mesurant non la LH mais plutôt son effet, soit la quantité de testostérone produite par des cellules interstitielles de rongeurs exposées à la LH.

Quoique le système basé sur la souris (MICT : **m**ouse **i**nterstitial **c**ell **t**estosterone) soit plus simple et produise des courbes d'étalonnage plus prononcées, les niveaux absolus de bioactivité pour la LH sérique mesurée en utilisant des cellules interstitielles de rat (RICT) semblent mieux correspondre à ceux mesurés *in vitro* par des préparations humaines homologues (Ding et al. , 1991). La capacité des titrations biologiques *in vitro* à reconnaître l'ensemble des molécules dotées d'une activité lutropique a depuis été amplement confirmée, indiquant un site bioactif comparable chez tous les peptides démontrant une activité de type LH.

Dans un article de 1976, Dufau et ses collaborateurs établirent que le 2^e IRP-hMG et le LER-907 présentaient des courbes semblables dans le système analytique *in vitro* utilisant les cellules interstitielles de rat (RICT), tout comme en présentaient certaines autres préparations dotées d'une bioactivité de type LH, incluant le hCG et la LH ovine (oLH). Ils mesurèrent pour le LER-907 une bioactivité *in vitro* de 98 UI/mg, soit une valeur de plus de 50% supérieure au potentiel de 60 UI/mg mesuré antérieurement *in vivo* par la National Pituitary Agency. Dufau et son groupe (1976) mesurèrent pour le LER-907 une immunoréactivité de 208 UI/mg (établie à 277 UI/mg par le National Pituitary Agency) et démontrèrent, par transformation log-logit des courbes d'étalonnage, l'existence d'un parallélisme entre les pentes obtenues par les préparations LER-907 et 2^e IRP-hMG.

Toujours selon ce même article, ces chercheurs tentèrent par la suite de comparer les concentrations sériques en LH en utilisant les systèmes *in vitro* RICT (bioactivité *in vitro*) et RIA (immunoréactivité *in vitro*). Leurs travaux mirent en évidence le parallélisme des courbes dose-réponse de la LH sérique dans le RICT mais passèrent curieusement sous silence celui du RIA. Dufau et collaborateurs trouvèrent que l'index B/I de la LH sérique était de 1,2 chez la femme normale, de 2,5 chez l'homme normal et de 2,6 chez la femme ménopausée, ces indices étant calculés en utilisant toutefois leur calibrateur-maison.

Ils montrèrent que la LH plasmatique de la femme normale correspondait aux activités biologique et immunologique du 2^e IRP-hMG, alors que l'activité biologique de la LH était sensiblement plus élevée dans le plasma de l'homme normal ou dans des situations avec accélération du taux sécrétoire. S'ils avaient choisi de calculer l'index B/I en regard de la bioactivité *in vivo* et de l'immunoréactivité établies par la National Pituitary Agency, ils auraient conclu que la LH sérique des hommes et des femmes postménopausées s'approchait de la bioactivité de la LH mesurée dans le hCG, alors que la bioactivité mesurée chez la femme normale aurait été inférieure. De plus, s'ils avaient calculé l'index B/I en termes de ng/mL de LER-907, les rapports auraient été deux fois plus élevés.

La source possible de ces importantes disparités fut dévoilée par les membres de l'équipe de Diczfalusy à l'occasion d'une série de travaux initiés en 1977 (Robertson et Diczfalusy, 1977). Ils furent en effet les premiers à montrer que seule une faible fraction du marqueur radio-iodé (l'antigène marqué) de la hLH était dotée de bioactivité, et que la spécificité envers la fraction antigénique bioactive dans le RIA était sensiblement améliorée par l'accroissement de la bioactivité de l'antigène-marqueur radio-iodé (Suginami, Robertson et Diczfalusy, 1978).

2.4.3 La séparation par focalisation isoélectrique

Les différentes formes de LH ne peuvent être distinguées sur la seule base de différences dans leur poids moléculaire; elles le peuvent par contre en tablant leurs différentes charges telles qu'observées par focalisation isoélectrique et techniques chromatographiques. Cela est possible du fait que chaque isohormone possède un pI qui lui est propre (Van Ginkel et Loeber, 1985).

La compréhension de la diversité des étalons de référence progressa véritablement lorsqu'ils furent soumis à des séparations par focalisation isoélectrique, traitements réputés séparer les protéines en fonction de leur glycosylation (Van Damme, Robertson et Diczfalusy, 1977 ; Zaidi, Qazi et Diczfalusy, 1982). On put alors constater que tant le 1^{er} IRP-hPG que le 2^e IRP-hMG présentaient des profils comparables; toutefois, ces profils différaient grandement de celui obtenu en focalisant la préparation purifiée de Hartree, soit le 1^{er} IRP-hLH / WHO 68/40 : cette dernière préparation ne contenait virtuellement aucune bioactivité dans ses fractions acides, alors que la moitié de la bioactivité des autres préparations se retrouvait dans leurs fractions acides (Robertson et Diczfalusy, 1977). Non seulement le 1^{er} IRP-hPG (WHO 69/104) contenait-il une part importante de sa bioactivité dans les fractions à pH inférieur à 6,5 lors de l'électrofocalisation, une proportion anormalement élevée de la LH immunoréactive s'y trouvait également (Robertson, Frøysa et Diczfalusy, 1978).

Quel contraste avec la distribution apparentée de la bioactivité et de l'immunoréactivité des fractions de la LH de la préparation WHO 68/40 qui se retrouvait autour du pH 7 lors de la séparation par focalisation isoélectrique. Ceci plaide fortement en faveur de l'existence d'isoformes de la LH. Il est maintenant bien accepté que la variabilité des espèces se situe, en partie du moins, au niveau de leur teneur en molécules d'acide sialique.

Storring et collaborateurs (1982) ont comparé les titrations biologiques *in vivo* et *in vitro* utilisant des LH purifiées. Ils ont examiné treize préparations différentes de hLH purifiées dans des titrations basées sur les deux systèmes biologiques *in vivo*, soit :

- ✓ la mesure du poids des vésicules séminales et
- ✓ l'appauvrissement ovarien en acide ascorbique,

et sur un système biologique *in vitro*, soit :

- ✓ la production de testostérone par les cellules interstitielles de souris (MICT).

En général, ils ont observé des corrélations significatives entre les valeurs mesurées par les deux systèmes *in vivo*. Par contre, pour quelques-unes des préparations de LH, la bioactivité différait par près de 300%. La mesure par le système *in vitro* MICT s'apparentait à la mesure par le système *in vivo* ovarien, quoique la mesure par le MICT donnait des valeurs franchement inférieures avec certaines préparations de LH et franchement supérieures avec certaines autres.

Par contre, les résultats au MICT ne présentaient aucune corrélation avec ceux obtenus par le système *in vivo* sur vésicules séminales à moins, lors des traitements statistiques, de prendre en compte, pour chacune des préparations, la fraction bioactive présente à pH alcalins lors de séparations par focalisation isoélectrique. Storring et collaborateurs (1982) indiquèrent que le temps d'exposition à une quantité bioactive de LH dans le plasma exerçait une influence plus grande sur la capacité réactionnelle du système vésical que sur celle du système ovarien puisque la réponse biologique était mesurée après trois jours de traitement à la LH dans le premier système, mais après seulement quatre heures dans le deuxième. Ils soulignèrent également que la purification de la hLH par chromatographie échangeuse d'ions favorisait la présence d'espèces moléculaires plus basiques dans les préparations.

Les isoformes plus alcalins de LH semblaient moins riches en molécules d'acide sialique, disposant ainsi de demi-vies plus courtes, plus courtes que celles des isoformes plus acides. Ainsi, une désialisation de la LH fut associée à une réduction de son potentiel bioactif *in vivo*, un effet conséquemment moins marqué dans un système *in vitro* non soumis aux mécanismes d'épuration biologique. Ils conclurent alors que les espèces acides de hLH avaient un potentiel bioactif *in vivo* relativement élevé, alors que la désialisation entraînait une réduction plus marquée *in vivo* qu'*in vitro* de cette bioactivité. Des disparités de même ordre furent constatées lorsque la bioactivité d'échantillons biologiques fut examinée par ces mêmes techniques de focalisation isoélectrique : la fraction bioactive la plus importante de la LH sérique se retrouvait dans celles :

- ✓ dont les pI étaient de pH supérieurs à 8.5 dans des échantillons sanguins prélevés en milieu de cycle menstruel ;
- ✓ dont les pI variaient entre des valeurs de pH de 7.5 - 8.5 dans des échantillons sanguins prélevés chez des femmes postménopausées et de pH plus faibles dans des extraits d'hypophyses de femmes postménopausées (Van Damme, Robertson et Diczfalusy, 1977 ; Zaidi, Qazi et Diczfalusy, 1982).

L'utilisation de préparations non purifiées de hLH comme étalons dans les titrations biologiques et immunologiques (RIA) de la hLH révélèrent donc des index B/I sensiblement plus élevés que ceux mesurés lors de l'utilisation d'étalons hautement purifiés, gardant en mémoire ici que la purification sur colonne échangeuse d'ions semble favoriser l'élution de fractions plus acides, donc plus sialisées et moins (bio)actives. Dans les préparations peu purifiées, de tels indices B/I élevés découleraient de la présence d'espèces immunoréactives de hLH plus bioactives.

Les variations de l'immunoréactivité et de la bioactivité de la LH à la puberté et décrites par l'équipe de Diczfalusy (Lucy et al., 1980) furent documentées par Burstein et collaborateurs (1985). Utilisant des échantillons de LH sérique analysés dans un système biologique *in vitro*, ils obtinrent des courbes dose-réponses parallèles tout au long de la puberté mais non en période pré-pubertaire. Ces résultats *in vitro* étaient loin de correspondre à ceux obtenus par techniques immunoréactives en cours de puberté, et cela même en présence d'un marqueur bioactif inséré dans le RIA utilisé.

De plus, et comparativement aux valeurs immunoréactives mesurées par RIA chez des mâles prépubères, ils observèrent des courbes avec pentes plus faibles dans le plasma de patients présentant un syndrome de Turner mais plus fortes chez des mâles pubertaires après stimulation à la GnRH, ou encore chez des mâles adultes tant avant qu'après lesdits traitements.

Pour ces études, les valeurs absolues des indices B/I semblaient être fonctions des étalons choisis ; toutefois, et indépendamment des étalons utilisés, l'approche immunoréactive annihilait ces élévations des B/I au niveau des valeurs basales en cours de puberté mais non pour les mesures effectuées chez des sujets pubères stimulés à la GnRH.

Ces études indiquaient que la source principale de variabilité de l'index B/I pour la hLH sérique résidait dans l'instabilité des attributs des courbes dose-réponses établies par RIA pour la LH plasmatique. Ces dissonances de l'index B/I mettaient en évidence un manque de spécificité du RIA pour la mesure de la bioactivité de la LH, quelques-unes des espèces de LH pouvant même antagoniser l'action de la LH (Beitins et Padmanabhan, 1991).

Ces constats expliquent l'exclusion de la mesure de la bioactivité de la LH par titration du récepteur. Encore une fois, la variabilité dans la mesure des index B/I semble imputable en grande partie à l'hétérogénéité de la glycosylation de la LH.

Il est toutefois sans oublier l'affirmation de certains auteurs voulant qu'une certaine hétérogénéité pouvait également résulter de modifications rencontrées au niveau des sous-unités elles-mêmes, modifications de la structure primaire pouvant survenir en périphérie et ainsi modifier à la baisse l'activité biologique de la LH (Ward et al., 1986; Kardana et al., 1991).

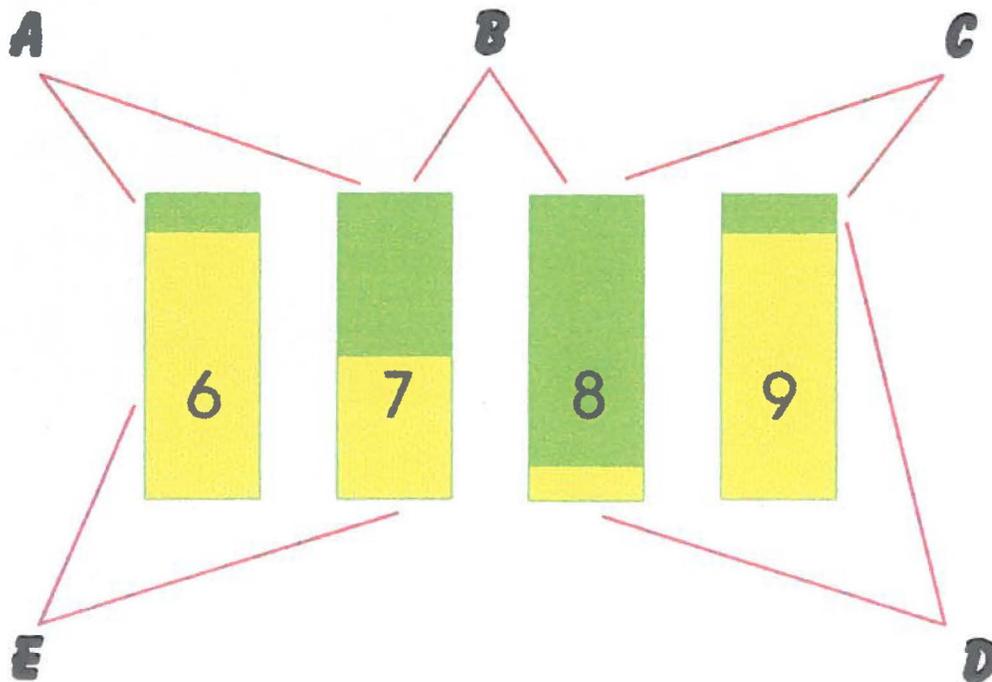


Figure 3. Modélisation de l'hétérogénéité moléculaire de la LH et des anticorps anti-LH. Cette représentation montre des espèces moléculaires de hLH dotées de pics isoélectriques situés à des pH entre 6 et 9. Le vert montre pour chacune des espèces la bioactivité relative de la molécule, alors que le jaune représente la portion non-bioactive de la molécule. Ce modèle veut illustrer que différentes isohormones peuvent varier entre elles dans leur bioactivité lutropique. Les lettres A, B, C, D et E représentent la spécificité de paires d'anticorps anti-LH, démontrant schématiquement que certains de ces anticorps sont spécifiques pour diverses zones bioactives alors que d'autres ne reconnaissent que des zones non-bioactives.

L'essentiel des informations colligées à ce jour suggère que la diversité observée dans la bioactivité et dans l'immunoréactivité des différentes préparations d'étalonnage de la LH et entre les échantillons sanguins d'individus à différents stades de leur vie de reproduction soit le reflet d'une hétérogénéité moléculaire de la LH et d'une hétérogénéité des anticorps utilisés. La Figure 3, construite selon les concepts énoncés par Rosenfield et Helke (1992), illustre bien cette problématique.

Plusieurs questions sont soulevées par l'ensemble de ces observations voulant que l'évaluation de l'index B/I puisse varier à l'intérieur d'un même échantillon selon la nature de l'étalon de référence choisi et selon la qualité du système immunométrique utilisé.

Entre autres, les disparités entre le potentiel biologique et le potentiel immunologique d'une molécule de LH questionne de manière particulière l'interprétation qui est faite, tant en recherche qu'en clinique, des mesures de la LH, mettant ainsi en évidence le besoin de systèmes analytiques plus spécifiques.

Selon Jeffcoate (1993), une séparation isoélectrique de LH révélerait de six à dix composés, i.e. des composés différant seulement en fonction de leur charge électrique respective ; de plus, il peut y avoir variation moléculaire des sucres sans toutefois que ladite charge varie. Au niveau moléculaire, il peut y avoir jusqu'à 100 glycoformes de LH.

L'avenir portera donc sûrement plus sur l'étude des sucres et des structures de glycosylation que sur l'étude de la chaîne peptidique porteuse. Considérant que c'est le potentiel biologique de la LH qui importe, une meilleure compréhension des structures biantennées s'impose donc.

Croire qu'une simple titration radioimmunologique ou radio-immunométrique permettra de bien cerner la fonction hormonale concernée s'apparente au temps pas si lointain où l'ensemble des fonctions androgéniques était recherché par la seule mesure des androgènes totaux mis en circulation.

Chapitre 3

Matériel et Méthodes

Les anticorps monoclonaux qui seront utilisés tout au long de ce travail sont ceux distribués mondialement par de grands fournisseurs internationaux : les firmes Serono d'Angleterre, Boehringer Manheim (BMC) et CIBA d'Allemagne, ROCHE de Suisse et Wallac de Scandinavie.

Les anticorps anti-LH de chacune de ces trousse sont, à une exception près (ROCHE), des anticorps monoclonaux hautement spécifiques dirigés contre des épitopes situés sur l'une ou l'autre des sous-unités de la LH ou sur les deux.

Chacune des trousse commercialisées par ces firmes possède deux anticorps anti-LH: un premier dédié à la capture de l'hormone ou d'une des sous-unités et généralement lié à une phase solide, permettant ainsi l'isolement de la molécule de LH des autres molécules de la matrice ; un deuxième anticorps, dédié au marquage (étiquetage) et permettant la quantification de l'hormone reconnue.

Selon la trousse considérée, ces anticorps sont dirigés contre la molécule intacte ou contre la chaîne α ou β de l'hormone (Tableau IV).

Ces systèmes analytiques commerciaux utilisés sur une base journalière présentent des caractéristiques fonctionnelles bien étayées.

Il faut souligner que nous avons eu la collaboration de différents laboratoires dans l'utilisation de chacun de ces systèmes : le laboratoire de chimie clinique (Dr Raymond Lepage) du pavillon St-Luc du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) pour le système analytique de la firme BMC ; le laboratoire de chimie clinique (Dr Gilles F. Brisson) de la Cité de la Santé de Laval pour le système analytique de la firme CIBA ; le laboratoire antidopage (Dr Martial Saugy) de l'Institut de médecine légale de Lausanne (Suisse) pour le système analytique de la firme ROCHE ; la compagnie Pharmacia (Baie d'Urfée) pour le système analytique de la firme Wallac ; enfin, celle du laboratoire antidopage de l'INRS-Santé pour le système MAIA CLONE™ de Serono.

| Trousse | Anticorps du système "sandwich" | | | Sigle usuel |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|
| | de capture | de marquage | Étalonnage | |
| BMC | Anti- β monoclonal | Anti-holo monoclonal | 2° SI 80/552 | ELISA |
| CIBA | Anti-holo monoclonal | Anti-holo monoclonal | 2° SI 80/552 | ICMA |
| WALLAC | Anti- β monoclonal | Anti- β monoclonal | 3° SI 75/537 | IFMA |
| ROCHE | Anti- β monoclonal | Anti- α polyclonal | 2° SI 80/552 | EIA |
| SERONO | Anti-holo monoclonal | Anti- β monoclonal | 1° IRP 68/40 | IRMA |

Tableau IV. Identification des anticorps utilisés par chacune des cinq firmes commerciales pour capturer et reconnaître l'antigène considéré, soit la LH. Le substantif anti-holo pourrait être substitué à anti-intact, les deux désignant un paratope nécessitant les deux sous-unités de la LH. ELISA : Enzyme linked immunoabsorbent assay ; ICMA : titration par immunocheminolumétrie ; IFMA : titration immunofluorométrique ; EIA : titration immunoenzymatique ; IRMA : titration immunoradiométrique. La préparation utilisée pour l'étalonnage de chacune des trousse est également mentionnée.

Le tableau ci-dessous (Tableau V) présente les caractéristiques analytiques principales de chacun de ces systèmes.

| | Coefficients de variation (%) | | | | | |
|---------------|-------------------------------|-------|---------|---------------------|-------|---------|
| | pour la précision... | | | pour la fidélité... | | |
| | Bas | Moyen | Élevées | Bas | Moyen | Élevées |
| SERONO | 11,4 | 1,6 | 1,9 | 13,3 | 4,3 | 5,5 |
| WALLAC | 5,2 | 6,2 | 5,2 | 8,6 | 3,5 | 3,2 |
| ROCHE | 2,4 | 2,2 | 2,4 | 4,2 | 3,2 | 2,6 |
| BMC | 5,2 | 4,6 | 4,7 | 2,9 | 3,8 | 5,3 |
| CIBA | 4,7 | 3,4 | 4,1 | 3,7 | 4,2 | 4,5 |

Tableau V. Coefficients de variation (%) qualifiant la précision (intra-essai) et la fidélité (inter-essai) des mesures de la LH par les cinq systèmes analytiques utilisés, tels que décrits par les compagnies.

3.1 Étude de stabilité des urines

Un premier travail voulut examiner le comportement de la molécule de LH sous différentes conditions, éprouvant ainsi celles qui apparaissaient essentielles à la stabilité de la molécule lors des différentes procédures opérationnelles (i.e. congélation, immunotitrations, etc.).

Un protocole exploratoire interpellait l'importance de certaines manipulations sur la stabilité de l'hormone. En effet, une séparation de la LH par chromatographie d'affinité, utilisant des anticorps monoclonaux comme outil de capture, donnait constamment des éluats très pauvres en LH (tels que quantifiés en utilisant des anticorps anti-LH monoclonaux) après une nécessaire élution en milieu acide à pH 2.5.

Le questionnement fut donc le suivant : sachant que l'acidité du milieu urinaire peut normalement osciller entre des pH variant de 5 à 8 (Saketos et al., 1994), des modifications de l'acidité de ce milieu modifient-elles l'antigénicité de la LH ?

Pour examiner cette problématique, dix millilitres de 18 échantillons urinaires différents furent centrifugés pendant dix minutes (2500g) à température ambiante et le surnageant fut retenu. Sur agitateur magnétique, un pH de 2,5 ou de 11,0 fut obtenu au moyen d'ajouts de HCl ou de NaOH, toujours en quantités minimales afin d'éviter une correction par effets de dilution. Ces échantillons (10 mL) furent soit acidifiés soit alcalinisés pendant une heure et, par la suite, mesurés par un système analytique radioimmunométrique (Serono) utilisant, par définition, des anticorps anti-LH monoclonaux .

3.2 Étude des effets de la congélation des urines

Point n'est besoin d'élaborer sur la nécessité en laboratoire de préserver les échantillons urinaires dans le but d'effectuer les analyses pertinentes à un moment distant de celui du prélèvement. Cela est particulièrement vrai en laboratoires dédiés à la lutte au dopage où le deuxième échantillon de chacun des prélèvements, l'échantillon "B", est systématiquement congelé pour permettre, le cas échéant, une confirmation officielle des résultats observés à l'analyse du premier échantillon, l'échantillon "A".

Considérant qu'entre urines non-congelées et urines congelées des différences dans les valeurs de la lutropinurie se manifestent à l'analyse, il est apparu pertinent d'examiner plus attentivement les effets de la congélation sur ces dites valeurs. Le protocole fut donc construit à la suite de la lecture d'un article de Reimers et ses collaborateur (1983).

Des échantillons de 1 mL d'urine fraîche furent préalablement mesurés pour leurs teneurs en LH en utilisant les anticorps monoclonaux des trousse MAIA CLONE™ de la compagnie Serono. Par la suite, ces mêmes échantillons furent congelés à -17°C. Après 24 heures de congélation, les valeurs de LH furent à nouveau quantifiées en utilisant les mêmes lots d'anticorps monoclonaux.

Une fois effectuée cette quantification, les échantillons furent recongelés pour une autre période de 24 heures, à la fin de laquelle la teneur en LH fut réévaluée. Il en fut ainsi pour quatre périodes de 24 heures.

3.3 Modification de la matrice urinaire

L'instabilité relative des mesures urinaires de la LH demandait donc la recherche d'un moyen de protection desdites molécules lors de la congélation. La littérature pertinente indiquait déjà que l'ajout de glycérol pouvait, suite à une congélation, préserver efficacement l'activité de la LH (Gekko et Timasheff, 1981; Saketos et al., 1994). L'extraction à l'acétone semblait également apporter une certaine protection lors de la congélation. Un traitement à l'urée (6 mol/L) était quant à lui réputé affecter à la baisse les mesures de la LH et ce, sans même soumettre l'échantillon à la congélation, effet probablement occasionné par une dissociation de la molécule (Saketos et al., 1994).

De plus, selon certains écrits, l'albumine apparaîtrait comme l'un des meilleurs moyens permettant de prévenir des pertes engendrées par phénomène d'adsorption (Livesey et Donald, 1982). Tout en sachant bien qu'il n'y a normalement presque pas d'albumine dans l'urine, il apparut intéressant d'explorer ce concept, toujours dans le but d'optimiser les mesures de LH urinaires pour des échantillons nécessairement soumis à la congélation. L'ajout de vitamine C ou de polyéthylène glycol (PEG) fut également proposé par certains collègues (communications personnelles).

Selon eux, l'acide ascorbique protégerait la molécule contre l'oxydation, alors que le PEG offrirait une certaine protection par enrobage de la molécule l'empêchant ainsi, lors de la congélation, d'être modifiée par des ponts hydrogénés interagissant autour d'elle.

Au préalable, par ajouts de quantités identiques à celles utilisées dans les protocoles décrits ci-dessous mais dans un tampon phosphate et non dans une matrice urinaire, des analyses furent effectuées afin d'établir si le PEG, l'albumine, la vitamine C, l'urée ou le glycérol présentaient une activité non-spécifique en réaction avec les anticorps de la trousse Serono. Les résultats s'avérèrent négatifs dans tous les cas, quoique pour l'albumine et le PEG une légère et non significative augmentation fut observée (1mUI/mL et 1,2 mUI/mL, respectivement).

Des échantillons additionnels d'urine fraîche donc furent prélevés le matin chez des volontaires issus des personnels du laboratoire. Chaque échantillon fut centrifugé et évalué pour leur teneur en LH en utilisant la trousse immunométrique MAIA CLONE™ de la compagnie Serono. Chacun des prélèvements urinaires fut divisé en deux aliquots: un premier servit de témoin expérimental alors que le deuxième fut modifié par ajouts matriciels.

3.3.1 Extraction à l'acétone

Le protocole suivi fut celui préconisé par Saketos et collaborateurs (1994). Schématiquement, il s'agissait d'utiliser 2,5 mL d'urine fraîche préalablement quantifiée pour sa teneur en LH, d'en ajuster le pH à 4.5 avec de l'acide acétique glaciale, d'agiter pendant une minute, d'y ajouter 5,5 mL d'acétone, d'incuber à température ambiante pendant 30 minutes et de centrifuger pendant 15 minutes. Par la suite, le surnageant était prélevé et asséché sous flot d'azote, le volume initial étant par la suite rétabli par ajouts de tampon phosphate de pH 6,9, le tout étant vortexé jusqu'à homogénéité.

Une partie était congelée (-17°C) et l'autre conservée à 4°C pour fins de comparaison des effets de la congélation.

3.3.2 Traitement au glycérol

Selon les informations décrites par Gekko et Timasheff en 1981 et Saketos et ses collaborateurs en 1994, il s'agissait de déposer 83 µL de glycérol (1,26 gm/mL mv: 92,09; ICN Biochemicals) dans 1 mL d'urine préalablement quantifiée pour sa teneur en LH, de bien agiter et d'en placer un aliquot au congélateur (- 17°C) et l'autre à 4 °C pour fins de comparaison.

3.3.3 Traitement à l'urée

Il s'agissait ici d'ajouter 1,8 g d'urée (NH₂CONH₂; CENCO) à l'échantillon urinaire, soit 6 mol/L par 5 mL d'urine, de bien mélanger jusqu'à dissolution de l'urée, d'incuber à température ambiante pendant 15 minutes et de placer soit au congélateur (-17°C) soit au réfrigérateur (4°C). Différentes concentrations d'urée furent examinées dans le but de déterminer la concentration la plus efficace. Des concentrations de 6 , de 8 et de 10 mol furent ajoutées à une même quantité d'urine : plus la molarité était importante, moins les quantités de LH étaient élevées. Selon un protocole issu de l'article de Saketos et ses collaborateurs (1994), une concentration de 6 moles fut choisie.

3.3.4 Traitement à l'albumine

En conformité avec les coordonnées décrites par Livesey et Donald (1982), dix millilitres d'urine contenus dans une éprouvette de 15 mL furent enrichis de 200 mg d'albumine bovine (0,02g/mL), le tout mélangé doucement par inversion.

3.3.5 Traitement à l'acide ascorbique

Il s'agissait d'ajouter 200 mg d'acide ascorbique à 10 mL d'urine et de mélanger jusqu'à dissolution complète. Après congélation, les échantillons contenant de l'acide ascorbique présentaient un dépôt orangé important, ce qui nécessita une centrifugation préalable au dosage.

3.3.6 Traitement au polyéthylèneglycol (PEG)

Il s'agissait d'ajouter 84 μ L de PEG à 1 mL d'urine et de bien mélanger par inversion. L'ajout de PEG immédiatement avant ou 24 hrs après (avec conservation à + 4⁰C) donna des résultats comparables (non décrits).

3.4 Urates et phosphates

L'ajout d'albumine semblant offrir un certain degré de protection contre les effets de la congélation, il fut alors convenu de toujours ajouter 0,02g/mL d'albumine bovine (BSA) aux urines lors des expérimentations subséquentes. Toutefois, et dans le but d'améliorer davantage les analyses, il fut également convenu d'examiner si l'appauvrissement de l'urine en urates et en phosphates exerçait un effet bénéfique sur la quantification de la lutropinurie. Ainsi s'ajoutait à la centrifugation et à l'ajout d'albumine, comme préalables à nos travaux, le retrait de ces sels. La question posée était donc la suivante : le manque de précision des dosages, et ce avec et sans ajout matriciel, serait-il associé à la présence dans la matrice urinaire d'une trop grande quantité de constituants divers qui seraient nuisibles à la reconnaissance épitope-paratope lors de l'incubation. Le protocole ci-dessous a donc voulu examiner si la présence des urates et des phosphates nuisait à la liaison antigène-anticorps lors de nos dosages urinaires par immunométrie. L'appauvrissement en urates et en phosphates fut obtenu par augmentation et par diminution du pH des échantillons urinaires, soit à un niveau de pH 8 pour permettre la précipitation des phosphates et à niveau de pH 4 pour permettre la précipitation des urates.

Après plusieurs tentatives effectuées dans le but de déterminer la méthodologie propice à la précipitation des urates et des phosphates, la suivante fut retenue : au préalable, il faut souligner qu'en raison de la grande diversité des urines, fonction de l'heure du prélèvement, des prises de médicaments ou de vitamines, du régime alimentaire, etc., il fallut adapter à chaque urine les quantités d'acide et de base à ajouter. Les quantités d'acide et de base ajoutées variaient donc selon l'effet produit et l'atteinte du pH désiré. Ainsi, au surnageant, après centrifugation de 10 minutes à 2500 x g, 0,02g/mL d'albumine bovine furent ajoutés. Les urates furent précipités en abaissant le pH à 4 avec du HCL.

Une incubation de 24 hrs à + 4⁰C fut par la suite nécessaire afin d'améliorer l'élimination de ces sels. Les échantillons furent centrifugés pendant 10 minutes et le surnageant conservé. Les phosphates furent précipités, quant à eux, en augmentant le pH à 8 (étape souvent accompagnée d'une certaine floculation). Suivait une période de centrifugation de 10 minutes. Finalement, le surnageant fut tamponé (tampon phosphate; 10% du volume; pH 6,9) et le pH rétablit à 7,4. Des aliquots d'urine furent prélevés à chacune des étapes dans le but de vérifier si l'un ou l'autre des traitements affectait la quantification de la lutropinurie.

3.5 Deux systèmes monoclonaux

L'urine contient, tout comme le sang, des quantités d'isohormones lutropiques et/ou simili-lutropiques. De plus, la majorité des manipulations auxquelles est soumis l'échantillon urinaire concerné est susceptible d'entraîner des modifications épitopiques, le plus souvent semble-t-il, par dissociation et fragmentation sous-unitaires, sans oublier celles touchant les arborisations glycosidiques. Étant confronté à tant de dilemmes, d'autres avenues se devaient d'être envisagées.

Ayant depuis le début quantifié la LH en utilisant la trousse radio-immunométrique commercialisée par Serono (IRMA), il fut convenu d'examiner un autre système analytique. L'expérimentation s'est donc poursuivie en ajoutant à l'arsenal analytique le système DELPHIA de Wallac, un système dit IFMA (immunofluorometric assay).

Plus précisément, alors que le système IRMA (immunoradiometric assay / titration radio-immunométrique) commercialisé par Serono fait appel pour la capture de l'antigène à un anticorps monoclonal (MAb), exigeant la présence des deux sous-unités², et à un MAb différent dont le paratope ne nécessite la présence que de la sous-unité β (anti-LH anti- β) pour sa liaison et son marquage permettant la quantification de la LH, le système analytique mis en marché par Wallac (Delphia) utilise, tant pour la capture que pour la lecture de l'hormone, deux Mabs distincts dirigés exclusivement vers la sous-unité β (2 anticorps monoclonaux anti- β).

L'essentiel des protocoles antérieurs fut donc repris, en comparant les résultats des deux trousse. Nous avons par le fait même ajouté certaines informations, ayant trait à chaque échantillon, afin de vérifier s'il y avait de possibles associations entre le sexe, le cycle menstruel et l'âge chronologique.

Ces deux outils analytiques permettraient-ils de mieux voir se profiler des isoformes afin que nous puissions attribuer à la présence de ces derniers les disparités couramment observées?

En dépit du fait que nous tamponnions les échantillons urinaires pour minimiser les variations de pH et les rendre comparables au milieu sanguin pour lequel la trousse MAIA CLONE™ (IRMA) de Serono est destinée, l'utilisation parallèle de ces deux systèmes analytiques pourrait permettre d'attribuer une partie des disparités observées à l'existence de phénomènes de dissociations sous-unitaires, le système analytique anglais (Serono) exigeant l'intégralité de la molécule pour sa capture, alors que le système scandinave (Wallac) ne requérant que la sous-unité β , tant pour la capture que pour la lecture.

² Indistinctement appelée dans le texte anticorps anti- $\alpha\beta$ ou anti-intact ou, encore, anticorps anti-holo car nécessitant la présence des deux sous-unités de la lutropine.

Malgré que ces deux systèmes analytiques soient étalonnés contre deux étalons de références différentes, ce qui peut expliquer certaines discordances, les protocoles ci-dessous furent construits pour examiner en parallèle les deux systèmes à base de mAbs dans le but de mettre en évidence la présence de dissociations sous-unitaires susceptibles d'expliquer les disparités observées lors des précédents protocoles. De plus, il fut, au cours du prochain protocole, tenu compte du sexe du sujet étudié tout comme de la phase menstruelle pour les participantes féminines, espérant ainsi obtenir quelques pistes supplémentaires sur des facteurs possiblement responsables d'une certaine hétérogénéité moléculaire pour la LH.

Les urines furent, comme dans les protocoles antérieurs, obtenues dans les minutes précédant l'expérimentation, centrifugées et les urates et les phosphates précipités. Les urines furent également tamponnées et enrichies en albumine bovine (comme précédemment indiqué) et examinées avant et après congélation. Des témoins ("blancs") de procédure ont indiqué que ces traitements n'agissaient en rien sur l'activité lutropique non-spécifique des échantillons tant dans le système IRMA que dans le système IFMA.

Il fut aussi décidé d'examiner plus à fond la LH d'ovulation : pouvions-nous confirmer les différences analytiques des deux systèmes analytiques en regard des espèces moléculaires relâchées dans cette période du cycle?

Une candidate s'est prêtée à l'examen, personne connaissant très bien chacune des phases de son cycle. Le matin, à l'arrivée au laboratoire, un échantillon d'urine était prélevé et son contenu immédiatement examiné pour sa teneur en LH en utilisant les deux outils analytiques dotés de mAbs différents.

Dans un autre protocole, nous avons voulu examiner si le moment du prélèvement pouvait révéler certains renseignements particuliers. Pour se faire, nous avons recueilli l'urine d'une même personne pendant 24 heures. Chacune des mictions fut quantifiée en LH selon le protocole habituel.

Enfin, notre interrogation s'est portée sur les effets de l'âge sur la quantification de la LH par ces deux mAbs différents. Ce protocole voulait examiner la lutropinurie de deux cohortes de sujets mâles, une âgée de moins de 25 ans, l'autre de plus de 45 ans. Les deux systèmes analytiques utilisés pouvaient-ils se comporter différemment en présence de LH plus basiques chez de jeunes mâles que chez des sujets plus âgés? L'examen des densités urinaires indiquant de grandes variations, certains échantillons étant plus dilués (1.012, 1.013, ...), d'autres étant plus concentrés (1.032,...), une mesure de la créatininurie fut effectuée et les résultats également exprimés par unité de créatinine.

3.6 Effet de la neuraminidase

Après avoir examiné les effets sur la lutropinurie de l'extraction préalable des urates et des phosphates de la matrice urinaire, il fut convenu d'examiner les effets de la présence ou non de molécules d'acide sialique sur l'antigénicité des isoformes de la lutropine. La désialisation fut effectuée au moyen de la neuraminidase, enzyme réputée pour son action spécifique sur le "cleavage" des molécules d'acide neuraminique situées en position distale de l'arborisation glycosidique.

Autrement formulée, la question posée est la suivante : dans nos systèmes analytiques, l'acide sialique apparaît-elle essentielle à la reconnaissance des anticorps dirigés contre la LH? De plus, une incubation préalable de l'urine à 37°C provoque-t-elle une altération de la molécule susceptible d'en modifier la reconnaissance paratopique?

3.7 Chromatographie par immunoaffinité

La présence d'isohormones rendant problématique toute quantification valable de la lutropinurie par dosages immunologiques, il fut convenu de mettre à profit de façon particulière et originale les anticorps anti-LH les plus commercialisés pour tenter de mettre en relief la présence de ces isohormones, sources, croyons-nous, d'une bonne part de l'incongruité observée, particulièrement lors de l'établissement des rapports T / LH.

L'approche utilisée fit appel aux principes de la loi d'action de masse pour optimiser la capture des isohormones contenues dans la matrice urinaire. Quels sont ces principes? Ils sont tracés à grands traits ci-dessous.

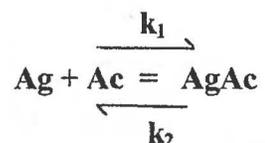


Figure 4. Représentation schématique de la loi d'action de masse où k_1 représente la constante d'association AgAc, k_2 la constante de dissociation AgAc, Ag la concentration en antigènes libres, Ac la concentration en anticorps libres et AgAc la concentration du complexe antigène-anticorps

Selon cette loi d'action de masse, une augmentation ou une diminution de la concentration d'un ou des produits du côté gauche de l'équation (l'antigène ou l'anticorps) a pour effet d'augmenter ou d'abaisser la concentration du produit du côté droit de l'équation, c'est-à-dire le complexe antigène/anticorps.

Succinctement, à l'équilibre, K exprime le rapport des concentrations des produits de chaque côté de l'équation, autrement dit la constante d'affinité de l'anticorps. Les constantes k_1 et k_2 établissent les concentrations finales des produits.

La constante d'affinité K fournit ainsi une mesure de l'énergie de la réaction entre les produits originaux mis en présence.

$$K = \frac{[\text{AgAc}]}{[\text{Ag}] [\text{Ac}]} = \frac{k_1}{k_2}$$

Figure 5. Expression de la constante d'affinité K où k_1 représente la constante d'association AgAc , k_2 la constante de dissociation AgAc , Ag la concentration en antigènes libres, Ac la concentration en anticorps libres et AgAc la concentration du complexe antigène-anticorps

En tablant sur ce principe, il fut décidé de procéder à l'appauvrissement de l'urine en LH en "extrayant" les isohormones tout en mettant à profit les propriétés des différents anticorps de capture mis en marché par lesdites firmes commerciales. Ainsi, en exposant la matrice urinaire à ces anticorps de capture liés sur phase solide (billes) et, après une période d'exposition déterminée, en retirant ces billes pour les remplacer par de nouvelles billes, nous maintenions en excès les concentrations d'anticorps et favorisons la formation du complexe antigène-anticorps, le facteur limitatif devenant, selon les principes de la loi d'action de masse, la concentration d'antigènes demeurant dans l'échantillon urinaire.

Une fois l'antigène extrait de la matrice urinaire et capté par l'anticorps lié en phase solide, demeurait la mesure quantitative de ces antigènes. Le protocole utilisé fit donc appel aux différents anticorps de marquage commercialisés par les firmes mentionnées.

Dans notre quête, nous nous sommes adressés au Laboratoire de chimie clinique de la Cité de la Santé de Laval, laboratoire utilisant de routine la technique CIBA pour quantifier la LH.

En mode préparatoire, nous avons donc voulu apprécier la cinétique particulière de l'extraction optimale des antigènes de la matrice urinaire. Cette exploration fut arbitrairement effectuée en utilisant les anticorps d'une trousse immunologique, celle commercialisée par la firme CIBA. Un échantillon de chacune des matrices urinaires fut prélevé après expositions successives aux anticorps monoclonaux de capture commercialisés par la firme pharmaceutique et par la suite quantifié par la trousse MAIA CLONE mais aussi par la même trousse soit CIBA.

3.8 Séparation par immunoaffinité

Le protocole précédant indiquait donc que la formule utilisée semblait des plus pertinentes à l'extraction par immunoaffinité d'isohormones de la LH; les retraits successifs du complexe antigène-anticorps à intervalles réguliers semblant fournir les conditions favorables à une extraction optimale de la LH de la matrice urinaire. Comme protocole ultime de ce travail, il fut donc convenu d'examiner la capacité d'extraction de chacun des anticorps de capture commercialisés et de mesurer les effets de ces captures par chacun des systèmes analytiques disponibles.

Chapitre 4

Résultats

4.1 Étude de stabilité

| Éch. # | Avant Traitement | Lutropinurie (mUI/ml) | |
|-----------|---------------------|--------------------------------|-----------------|
| | | après exposition de 60 mn à... | |
| | | pH 2,5 | pH 11,0 |
| 1 | 7,4 | | nd ¹ |
| 1 | 7,7 | 6,7 (-13%) ² | nd |
| 1 | 7,8 | | nd |
| 2 | 60,7 | | nd |
| 3 | 40,6 | | nd |
| 4 | 6,1 | 4,0 (-36%) | nd |
| 4 | 6,5 | 4,3 (-34%) | nd |
| 5 | 8,4 | 7,8 (-07%) | nd |
| 5 | 8,2 | 8,1 (-01%) | nd |
| 6 | 3,4 | 2,8 (-18%) | nd |
| 7 | 6,3 | 4,6 (-27%) | nd |
| 8 | 4,0 | 3,5 (-14%) | nd |
| 9 | 3,6 | 3,0 (-17%) | nd |
| 10 | 2,4 | 1,6 (-33%) | nd |
| 11 | 8,6 | 7,5 (-13%) | nd |
| 12 | 7,4 | 6,4 (-14%) | nd |
| 13 | 2,0 | 1,5 (-25%) | nd |
| 14 | 6,0 | 4,0 (-33%) | nd |
| 15 | 4,0 | 2,5 (-18%) | nd |
| 16 | 3,5 | 3,0 (-14%) | nd |
| 17 | 2,5 | 1,5 (-40%) | nd |
| 18 | 8,3 | 7,5 (-10%) | nd |

Tableau VI. Valeurs de la lutropinurie avant et après une exposition de 60 minutes à des milieux acides (pH 2,5) ou alcalins (pH 11,0). Les chiffres en indice se veulent pour : 1 = valeurs non détectables; 2 = écart à la valeur initiale.

Le premier constat indique que le fait de répéter la mesure d'un même échantillon peut à elle seule révéler de légères différences quantitatives (Tableau VI, échantillons #1, #4, #5). En ce qui concerne plus spécifiquement les traitements à pH acides et basiques auxquels furent soumis les échantillons d'urine, il semble qu'en milieu acide la reconnaissance de l'épitope par l'anticorps soit modifiée sensiblement, une chute moyenne de 20% étant observée. En milieu alcalin, plus aucune lecture n'était possible sur la courbe d'étalonnage du système analytique utilisé, les valeurs étant en deçà des valeurs minimales mesurables.

4.2 Effets de la congélation

| Éch. | Lutropinurie (mUI / ml) | | | | |
|------|--|------|------|------|------|
| | Périodes de congélation (24hr / période) | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 3,7 | 4,9 | 4,5 | 5,8 | 5,3 |
| 2 | 5,0 | 4,6 | 4,8 | 5,1 | --- |
| 3 | 3,8 | 2,9 | 2,4 | 2,5 | 3,4 |
| 4 | 5,5 | 5,1 | 5,0 | 5,9 | 5,1 |
| 5 | 40,0 | 39,7 | --- | --- | --- |
| 6 | 60,7 | 63,9 | 59,7 | 59,3 | 62,7 |
| 7 | 49,7 | 37,7 | --- | --- | --- |
| 8 | 43,5 | 28,3 | --- | --- | --- |
| 9 | 79,7 | 54,1 | --- | --- | --- |
| 10 | 81,4 | 69,9 | --- | --- | --- |

Tableau VII. Effets de l'absence ou de la présence de multiples (0 à 4) périodes d'exposition de 24 heures chacune à -17°C sur les valeurs de la lutropinurie (mUI/mL) de dix échantillons différents d'urine.

Le tableau ci-dessus (Tableau VII) présente les valeurs des lutropinuries après exposition à de multiples périodes de congélation – décongélation à -17°C .

De manière générale, on constate que les quantités de LH urinaire ont plutôt tendance à diminuer après une première congélation de 24 heures. Ce phénomène serait possiblement plus marqué lorsque les valeurs de la lutropinurie sont plus importantes. Il semble de plus que la répétition des congélations n'entraîne pas d'affaissement additionnel des niveaux : au contraire, les valeurs de la lutropinurie se maintiendraient ou auraient même tendance à se renormaliser avec la répétition des cycles congélation / décongélation.

4.3 Modification de la matrice urinaire

Le tableau qui suit (Tableau VIII) présente les résultats obtenus avec trois urines différentes, avant et après congélation (24 heures), avec ou sans l'ajout matriciel de glycérol, extraction à l'acétone et traitement à l'urée.

| Éch. | Lutropinurie ¹ (mUI/mL) après traitement à... | | | |
|------------------------------|--|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | Aucun (x^0/y^0) | glycérol (x^g/y^g) | Acétone (x^a/y^a) | Urée (x^u/y^u) |
| 1 | 50 / 37 | 42 / 33 | 34 / 27 | 20 / 19 |
| 2 | 45 / 28 | 35 / 25 | 18 / 15 | 12 / 10 |
| 3 | 80 / 54 | 56 / 43 | 42 / 31 | 22 / 20 |
| Σ | 175 / 119 | 133 / 101 | 94 / 77 | 54 / 49 |
| $\Delta_{\Sigma}(x^0 - x^i)$ | | - 42 | - 81 | - 121 |

Tableau VIII. Effets de modifications matricielles sur la mesure de la lutropinurie avant (X) et après (Y) une période de 24 heures de congélation à -17°C .

La congélation affecterait la quantification de la LH par le système MAIA CLONE. L'ajout de glycérol ou l'extraction à l'acétone ne semble pas protéger des effets apportés par la congélation. Le traitement à l'urée semble affecter la reconnaissance de la LH à même titre que la congélation.

Les résultats suivants présentent les ajouts matriciels effectués en parallèle à ceux décrits plus haut.

| EFFET DE L'ENRICHISSEMENT DE LA MATRICE URINAIRE SUR LA MESURE RADIO- IMMUNOMÉTRIQUE DE LA LUTROPINE URINAIRE (mUI/mL) | | | | | | | | | | |
|---|--------|--------|---------|-----|---------|----------|------|--|--|--|
| Substances ajoutées à la matrice urinaire | | | | | | | | | | |
| Éch. | Aucune | Album. | Vita. C | PEG | Acétone | Glycérol | Urée | | | |
| 1 | 53 | 59 | 17 | 55 | 31 | 42 | 17 | | | |
| | 44 | 48 | 10 | 53 | 28 | 38 | 17 | | | |
| 2 | 08 | 10 | 8 | 11 | 03 | 04 | 02 | | | |
| | 05 | 08 | 08 | 12 | 04 | 03 | 03 | | | |
| 3 | 36 | 39 | 8 | 35 | 19 | 15 | 11 | | | |
| | 34 | 42 | 28 | 40 | 20 | 18 | 12 | | | |
| 4 | 17 | 30 | 8 | 35 | 12 | 08 | 10 | | | |
| | 04 | 27 | 13 | 42 | 11 | 09 | 08 | | | |
| 5 | 39 | 40 | 8 | 40 | 16 | 19 | 14 | | | |
| | 43 | 40 | 31 | 45 | 17 | 26 | 14 | | | |
| 6 | 49 | 48 | 30 | 47 | 24 | 30 | 15 | | | |
| | 56 | 42 | 37 | 55 | 28 | 37 | 19 | | | |
| 7 | 52 | 50 | 29 | 78 | 45 | 42 | 20 | | | |
| | 51 | 52 | 36 | 50 | 39 | 46 | 22 | | | |
| 8 | 84 | 87 | 59 | 81 | 61 | 47 | 34 | | | |
| | 78 | 85 | 55 | 90 | 56 | 61 | 38 | | | |

Tableau IX. Valeurs de la lutropinurie avant (chiffres à gauche de la colonne) et après (chiffres à droite de la colonne) congélation de huit échantillons urinaires différents soumis à différents traitements. Pour l'acétone, il s'agit plutôt d'une extraction préalable.

En générale, les ajouts matriciels de glycérol, d'urée, de PEG, de vitamine C tout comme l'extraction à l'acétone modifient à la baisse les valeurs de la LH urinaire. Mis à part l'ajout d'albumine à la matrice urinaire, l'ajout de vitamine C, de PEG ou de glycérol ne semble pas stabiliser les lectures de la LH après congélation. Il en est de même lors de l'extraction à l'acétone. Encore une fois le traitement à l'urée semble apporter les même modifications à la LH que celles engendrées par la congélation.

| EFFET DE L'ENRICHISSEMENT DE LA MATRICE URINAIRE SUR LA MESURE RADIO-IMMUNOLOGIQUE (RIA) DE LA LUTROPINURIE (mUI/mL) | | | | | | | | | | | |
|---|-----|--------|--------|--------|-----|---------|----------|------|--|--|--|
| Substances ajoutées à la matrice urinaire | | | | | | | | | | | |
| Éch. | MAB | Aucune | Album. | Vit. C | PEG | Acétone | Glycérol | Urée | | | |
| 1 | 53 | 53 | 21 | 31 | 54 | 39 | 36 | 167 | | | |
| | 44 | 29 | 47 | 25 | 41 | 28 | 40 | 44 | | | |
| 2 | 8 | 7 | 12 | 12 | 11 | 28 | 9 | 25 | | | |
| | 5 | 9 | 10 | 12 | 10 | 10 | 9 | 22 | | | |
| 3 | 36 | 76 | 37 | 26 | 25 | 28 | 20 | 44 | | | |
| | 34 | 34 | 23 | 20 | 35 | 16 | 21 | 37 | | | |
| 4 | 17 | 33 | 12 | 18 | 25 | 7 | 12 | 44 | | | |
| | 4 | 7 | 25 | 20 | 31 | 15 | 17 | 19 | | | |
| 5 | 39 | 21 | 36 | 12 | 22 | 36 | 31 | 55 | | | |
| | 43 | 30 | 32 | 44 | 25 | 20 | 22 | 24 | | | |
| 6 | 49 | 28 | 30 | 28 | 21 | 23 | 45 | 24 | | | |
| | 36 | 49 | 35 | 29 | 46 | 29 | 33 | 50 | | | |
| 7 | 52 | 105 | 23 | 34 | 23 | 49 | 18 | 33 | | | |
| | 51 | 33 | 40 | 45 | 39 | 31 | 32 | 38 | | | |
| 8 | 84 | 57 | 50 | 23 | 36 | 33 | 32 | 28 | | | |
| | 78 | 36 | 46 | 41 | 55 | 42 | 45 | 44 | | | |

Tableau X. Valeurs de la lutropinurie telles que quantifiées au moyen d'un système analytique utilisant un anticorps polyclonal, avant et après (valeurs à gauche et à droite de la colonne, respectivement) congélation de 8 éch. urinaires différents soumis à différents traitements. Pour fins de comparaison, les effets de la congélation sur la valeur de la lutropinurie telle que mesurée par système radioimmunométrique (MAB), sont présentés pour chacun des huit échantillons mesurés (colonne marron).

Afin de comprendre encore mieux l'activité qu'engendrait ces ajouts matriciels, il apparut pertinent de quantifier les mêmes échantillons urinaires mais, cette fois-ci, en utilisant un système polyclonal mis en marché par la compagnie ICN de Montréal (Tableau X). On

constate que même sans aucun ajout matriciel et sans congélation, les quantités de LH mesurées par système analytique utilisant un anticorps monoclonal peuvent différer sensiblement de celles obtenues lorsque le système analytique utilise un anticorps polyclonal. La mesure quantitative lors du traitement à l'urée semble améliorée par l'utilisation d'anticorps polyclonaux avant congélation (mis à part les échantillons 6-7 et 9), mais devient non significative après congélation.

4.4 Urates et phosphates

| Lutropinurie (mUI/mL) sur des échantillons frais non enrichis en albumine après précipitation des... | | | |
|--|----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Nil | Urates pH 4 à 7,4 | Phosphates pH 8 à 7,4 | Urates/phosphate pH 4 à 8 à 7,4 |
| 22,5 | 20,7 | 23,0 | 20,0 |
| 4,0 | 4,0 | 3,7 | 3,7 |
| 7,0 | 6,5 | 7,0 | 6,2 |
| 48,0 | 44,0 | 26,0 | 44,0 |
| 15,0 | 12,0 | 10,0 | 12,0 |
| 4,0 | 3,2 | 3,3 | 3,4 |

Tableau XI. Valeurs de la lutropinurie (mUI/mL) sans aucune précipitation (Nil) et avec précipitation soit des urates, soit des phosphates ou soit des deux.

La précipitation des urates et des phosphates ne semble pas améliorer sensiblement la stabilité des mesures lutropiques urinaires (Tableau XI et XII). S'il est vrai que la précipitation des urates et des phosphates améliore la cinétique de réaction entre l'anticorps et l'antigène, ces modifications furent sans effet apparent sur la quantification de la lutropinurie, comme nous pouvons le constater avec des titrations tantôt plus élevées, plus faible ou égales à celles obtenues au départ, i.e. sans précipitation des sels. L'ajout ou non d'albumine apparaît également discutable.

| Lutropinurie (mUI/mL) d'échantillons frais enrichis en albumine lors de la précipitation des urates et des phosphates | |
|---|-------|
| Avant | Après |
| 4,0 | 1,6 |
| 4,0 | 3,6 |
| 9,0 | 8,0 |
| 7,0 | 9,0 |
| 6,0 | 6,5 |
| 2,0 | 2,0 |
| 4,0 | 9,1 |
| 9,0 | 10,0 |
| 3,7 | 4,0 |
| 6,0 | 6,3 |

Tableau XII. Valeurs de la lutropinurie (mUI/mL) avant et après précipitation des urates et des phosphates.

4.5 Deux systèmes monoclonaux

La comparaison des deux trousse procure certains enseignements. En effet, l'examen des résultats d'analyses indique que les anticorps de la trousse IFMA (capture et lecture par mAbs anti- β) pourraient être plus spécifiques que ceux de la trousse IRMA (capture par anti- $\alpha\beta$ et lecture anti- β); de manière générale, la trousse IRMA donne des valeurs en moyenne du tiers supérieures (colonnes bleues à chiffres gris : moyenne = 1.33) à celles obtenues par la trousse IFMA.

| | | Lutropinurie (mUI / ml) | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|-------------------------|-----|-----|----|------|-------|-------------------|------|------|-------|-------|------|------|
| | | avant congélation | | | | | | après congélation | | | | | | |
| | | | | | | Urée | | Urée | | | | | | |
| Mabs | # | pH | XY | Âge | Cy | Tém. | Alb. | 6M | 10M | Tém. | Alb. | 6M | 10M | |
| IRMA | 1 | 6.4 | ♀ | 40 | M | 2.4 | 3.0 | 1.7 | 1.4 | 2.4 | 2.6 | 0.5 | 0.5 | |
| | 2 | 7.0 | ♀ | 24 | F | 13.8 | 14.9 | 6.7 | 4.5 | 13.9 | 15.0 | 4.6 | 3.0 | |
| | Capture | 3 | 5.9 | ♀ | 46 | H | 2.9 | 4.0 | 1.2 | 0.5 | 2.6 | 3.7 | 1.5 | 0.5 |
| | ↓ | 4 | 7.2 | ♂ | 33 | - | 6.9 | 7.4 | 2.3 | 1.4 | 6.6 | 7.4 | 2.4 | 0.5 |
| | Anti-αβ | 5 | 6.2 | ♀ | 31 | L | 2.5 | 2.7 | 0.4 | 0.4 | 2.5 | 2.7 | 0.4 | 0.4 |
| | 6 | 5.7 | ♂ | 21 | - | 14.7 | 14.7 | 5.6 | 2.5 | 12.5 | 15.3 | 5.2 | 3.5 | |
| | Lecture | 7 | 6.4 | ♀ | 31 | M | 5.0 | 6.9 | 5.2 | 2.0 | 4.2 | 6.6 | 2.7 | 1.7 |
| | ↓ | 8 | 6.0 | ♀ | 21 | O | 150.7 | 177.0 | 45.6 | 40.8 | 147.0 | 177.0 | 41.7 | 28.8 |
| | Anti-β | 9 | 7.0 | ♀ | 24 | L | 12.9 | 15.7 | 5.9 | 4.1 | 11.5 | 15.8 | 5.1 | 3.5 |
| | 10 | 6.1 | ♂ | 54 | - | 4.8 | 4.4 | 2.6 | 1.3 | 4.8 | 5.4 | 2.4 | 1.7 | |
| | 11 | 5.9 | ♀ | 32 | O | 61.6 | 62.8 | 23.8 | 11.5 | 65.0 | 73.0 | 24.1 | 11.0 | |
| | 12 | 7.1 | ♀ | 26 | F | 2.5 | 3.6 | 1.3 | 1.5 | 2.7 | 3.5 | 1.4 | 1.2 | |
| Mabs IFMA | 1 | 6.4 | ♀ | 40 | M | 0.9 | 1.0 | 0.5 | 0.4 | 0.7 | 1.1 | 0.3 | 0.2 | |
| | 2 | 7.0 | ♀ | 24 | F | 14.4 | 14.4 | 7.3 | 5.6 | 13.8 | 13.3 | 7.6 | 5.5 | |
| | Capture | 3 | 5.9 | ♀ | 46 | H | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 0.6 | 1.5 | 1.6 | 0.7 | 0.4 |
| | ↓ | 4 | 7.2 | ♂ | 33 | - | 6.0 | 6.2 | 3.8 | 3.0 | 6.0 | 5.7 | 3.2 | 2.2 |
| | Anti-β | 5 | 6.2 | ♀ | 31 | L | 1.0 | 1.2 | 0.7 | 0.6 | 0.8 | 1.3 | 0.7 | 0.6 |
| | 6 | 5.7 | ♂ | 21 | - | 14.5 | 13.4 | 7.7 | 6.3 | 15.4 | 11.3 | 6.7 | 5.3 | |
| | Anti-β | 7 | 6.4 | ♀ | 31 | M | 3.7 | 3.9 | 2.2 | 1.4 | 2.7 | 3.0 | 1.7 | 1.4 |
| | ↓ | 8 | 6.0 | ♀ | 21 | O | 161.1 | 160.5 | 96.7 | 67.7 | 117.2 | 116.7 | 82.3 | 62.8 |
| | Anti-β | 9 | 7.0 | ♀ | 24 | L | 15.7 | 16.6 | 8.0 | 5.3 | 10.8 | 10.3 | 6.1 | 4.5 |
| | 10 | 6.1 | ♂ | 54 | - | 3.4 | 3.5 | 1.9 | 1.4 | 2.8 | 2.8 | 1.6 | 1.3 | |
| | 11 | 5.9 | ♀ | 32 | O | 18.0 | 45.9 | 22.5 | 15.9 | 35.0 | 33.9 | 22.6 | 13.7 | |
| | 12 | 7.1 | ♀ | 26 | F | 1.3 | 1.2 | 0.6 | 0.5 | 0.8 | 1.3 | 0.5 | 0.4 | |
| Mabs IRMA / IFMA | 1 | 6.4 | ♀ | 40 | M | 2.7 | 3.0 | 3.4 | 3.5 | 3.4 | 2.6 | 1.7 | 2.5 | |
| | 2 | 7.0 | ♀ | 24 | F | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 1.0 | 1.1 | 0.6 | 0.5 | |
| | 3 | 5.9 | ♀ | 46 | H | 1.8 | 2.5 | 1.5 | 0.8 | 2.0 | 2.3 | 2.1 | 1.3 | |
| | 4 | 7.2 | ♂ | 33 | - | 1.2 | 1.2 | 0.6 | 0.5 | 1.1 | 1.3 | 0.8 | 0.2 | |
| | IRMA | 5 | 6.2 | ♀ | 31 | L | 2.5 | 2.3 | 0.6 | 0.7 | 2.9 | 2.1 | 0.6 | 0.7 |
| | 6 | 5.7 | ♂ | 21 | - | 1.0 | 1.1 | 0.7 | 0.4 | 0.9 | 1.4 | 0.8 | 0.7 | |
| | IFMA | 7 | 6.4 | ♀ | 31 | M | 1.4 | 1.8 | 2.4 | 1.4 | 1.6 | 2.2 | 1.6 | 1.2 |
| | 8 | 6.0 | ♀ | 21 | O | 0.9 | 1.1 | 0.5 | 0.6 | 1.5 | 1.5 | 0.5 | 0.5 | |
| | 9 | 7.0 | ♀ | 24 | L | 0.8 | 0.9 | 0.7 | 0.8 | 1.1 | 1.5 | 0.8 | 0.8 | |
| | 10 | 6.1 | ♂ | 54 | - | 1.4 | 1.3 | 1.4 | 0.9 | 1.7 | 1.9 | 1.5 | 1.3 | |
| | 11 | 5.9 | ♀ | 32 | O | 1.5 | 1.6 | 1.1 | 0.7 | 1.8 | 2.2 | 1.1 | 0.8 | |
| | 12 | 7.1 | ♀ | 26 | F | 1.9 | 3.0 | 2.2 | 3.0 | 3.4 | 2.7 | 2.8 | 3.0 | |

Tableau XIII. Valeurs de la lutropinurie telles que mesurées par techniques IRMA et IFMA avant et après congélation de 12 échantillons traités ou non à l'albumine et à l'urée. Légende: Cy = cycle menstruel; M = phase menstruelle; = phase folliculaire; L = phase lutéale; O = ovulation. L'utilisation des couleurs est expliquée dans le texte.

| Phase | pH | Densité | Lutropinurie (mUI / ml) | | |
|-----------------|-----|---------|---|--|----------------|
| | | | IRMA anti- α /anti- β (Serono) | IFMA anti- β /anti- β (Wallac) | IRMA / IFMA |
| Lutéale | 7.0 | 1.015 | 9.8 | 9.5 | 1.0 |
| Menstruelle | 6.7 | 1.016 | 7.7 | 8.5 | 0.9 |
| Folliculaire | 6.5 | 1.015 | 8.0 | 8.5 | 0.9 |
| Pré-ovulatoire | 5.7 | 1.026 | 20.2 | 18.6 | 1.1 |
| Pic ovulatoire | 5.9 | 1.027 | 96.1 | 84.0 | 1.1 |
| Post-ovulatoire | 6.9 | 1.011 | 7.5 | 4.7 | 1.6 |

Tableau XIV. Valeurs de la lutropinurie déterminées aux différents stades du cycle menstruel chez une même personne.

Une meilleure identification des sujets ayant volontairement participé à l'étude a permis de valider nos observations en fonction du cycle menstruel. Au tableau XIV, exemple où un sujet en ovulation présentait des valeurs beaucoup plus élevées que celles en phase lutéale ou en périodes menstruelles.

| heures | pH | Densité | LUTROPINURIE (UI / L) | | |
|--------|-----|---------|--|---|----------------|
| | | | anti- α / anti- β (IRMA) | anti- β / anti- β (IFMA) | IRMA / IFMA |
| 13:00 | 6.4 | 1.017 | 9.8 | 9.6 | 1.0 |
| 18:45 | 6.0 | 1.016 | 5.6 | 4.4 | 1.3 |
| 20:45 | 6.3 | 1.015 | 4.0 | 3.6 | 1.1 |
| 23:00 | 5.6 | 1.007 | 3.4 | 1.3 | 2.6 |
| 01:30 | 5.6 | 1.007 | 3.8 | 1.7 | 2.2 |

Tableau XV. Valeurs de la lutropinurie telles qu'appréciées par deux systèmes analytiques pour chacune des mictions d'un individu au cours d'une même journée.

Il semble encore une fois, d'après le tableau XV que le système de Serono mesure des espèces moléculaires que le système Wallac ne peut mesurer.

| Éch | Âge | pH | miction | Densité | Créatinine (mM/L) | Lutropinurie (UI/L) | | | | | |
|-----|-----|-----|-----------|---------|----------------------|---|---|--------------|---|---|--------------|
| | | | | | | LH | | | LH / créatinine (UI/mM) | | |
| | | | | | | Anti- $\alpha\beta$ + anti- β (IRMA) | anti- β + anti- β (IFMA) | IRMA IFMA | anti- $\alpha\beta$ + anti- β (IRMA) | anti- β + anti- β (IFMA) | IRMA IFMA |
| 1 | 22 | 5.6 | matin | 1.032 | 24.4 | 20.8 | 27.4 | 0.8 | 0.9 | 1.1 | 0.8 |
| 2 | 24 | 5.5 | matin | 1.017 | 08.0 | 04.5 | 02.4 | 1.9 | 0.6 | 0.3 | 2.0 |
| 3 | 19 | 6.5 | matin | 1.018 | 08.1 | 10.9 | 10.8 | 1.0 | 1.3 | 1.3 | 1.0 |
| 4 | 24 | 5.7 | soir | 1.020 | 13.7 | 09.1 | 08.1 | 1.1 | 0.7 | 0.6 | 1.2 |
| 5 | 18 | 6.6 | soir | 1.026 | 14.8 | 07.4 | 08.2 | 0.9 | 0.5 | 0.6 | 0.8 |
| 6 | 21 | 6.8 | matin | 1.013 | 07.3 | 09.0 | 07.6 | 1.2 | 1.2 | 1.0 | 1.2 |
| | | | Moyenne → | | 12.7 | 10.3 | 10.8 | 1.2 | 0.9 | 0.8 | 1.2 |
| 7 | 54 | 5.3 | matin | 1.024 | 12.4 | 04.6 | 03.9 | 1.2 | 0.4 | 0.3 | 1.3 |
| 8 | 56 | 5.5 | matin | 1.018 | 12.6 | 04.3 | 02.9 | 1.5 | 0.3 | 0.2 | 1.5 |
| 9 | 51 | 5.7 | matin | 1.012 | 09.9 | 05.7 | 03.6 | 1.6 | 0.6 | 0.4 | 1.5 |
| 10 | 46 | 7.2 | soir | 1.015 | 06.0 | 03.9 | 02.8 | 1.4 | 0.7 | 0.5 | 1.4 |
| 11 | 48 | 5.7 | matin | 1.017 | 09.7 | 05.1 | 03.5 | 1.5 | 0.5 | 0.4 | 1.3 |
| 12 | 59 | 6.6 | matin | 1.016 | 09.5 | 07.5 | 07.5 | 1.0 | 0.8 | 0.8 | 1.0 |
| | | | Moyenne → | | 10.0 | 05.2 | 04.0 | 1.4 | 0.6 | 0.4 | 1.3 |

Tableau XVI. Lutropinurie chez 2 cohortes masculines établies en fonction de l'âge et telle que mesurée par les deux systèmes analytiques de type sandwich. Les valeurs de la créatininurie furent utilisées pour corriger les valeurs hormonales.

Les espèces moléculaires de la LH seraient différentes chez les sujets en phases pubères par rapport aux sujets plus âgés.

4.6 Effets de la neuraminidase

| Système analytique | Lutropinurie (UI / L) | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|------|------|-------------------|------|------|
| | Avant congélation | | | Après congélation | | |
| | Ajouts de neuraminidase (enzyme / LH) | | | | | |
| | Nil | 1/30 | 1/10 | Nil | 1/30 | 1/10 |
| IRMA | 17,3 | 17,1 | 18,7 | 20,3 | 17,1 | 18,0 |
| IFMA | 18,0 | 19,5 | 20,0 | 19,1 | 14,7 | 18,4 |

Tableau XVII. Effets d'ajouts de neuraminidase sur la lutropinurie avant et après une période de six jours de congélation à -17°C sur les valeurs de la lutropinurie telles que mesurées par deux systèmes analytiques (IRMA de Serono et IFMA de Wallac).

| Incubation: 37°C → Neuraminidase (%U / UdeLH) → | LUTROPINURIE : VARIATION (%) ET VALEURS ABSOLUES (UI/L) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|-------|-----|-------------------------------------|------|-----|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Avant congélation | | | | Après congélation (6 jours à -17°C) | | | | | | | | | | | |
| | 0 mn | 0 | 60 mn | 3.3 | 10 | 0 mn | 0 | 60 mn | 3.3 | 10 | | | | | | |
| Anti-I/Anti-β (IRMA) | 100% | 88% | 87% | 95% | 104% | 77% | 87% | 92% | 19.6 | 17.3 | 17.1 | 18.7 | 20.3 | 15.1 | 17.1 | 18.0 |
| Anti-β/Anti-β (IFMA) | 100% | 81% | 88% | 90% | 86% | 49% | 67% | 83% | 22.1 | 18.0 | 19.5 | 20.0 | 19.1 | 10.9 | 14.7 | 18.4 |
| IRMA / IFMA | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 0.9 | 1.1 | 1.4 | 1.2 | 1.0 | | | | | | | | |

Tableau XVIII. Effet de la présence ou de l'absence d'une période d'incubation de 60 minutes à 37°C sur les valeurs de la lutropinurie (variation en % et valeurs absolues en rouge) d'une urine obtenue d'un jeune mâle adulte et traitée à différentes concentrations de neuraminidase et telles que mesurées au moyen de deux systèmes analytiques (IRMA de Serono et IFMA de Wallac).

Les deux systèmes analytiques semblent mesurer plus de LH lorsque l'on en retire l'acide sialique (Tableau XVII). La LH désialisée apparaît moins vulnérable aux effets apportés par la congélation et au traitement à 37° C (Tableau XVIII).

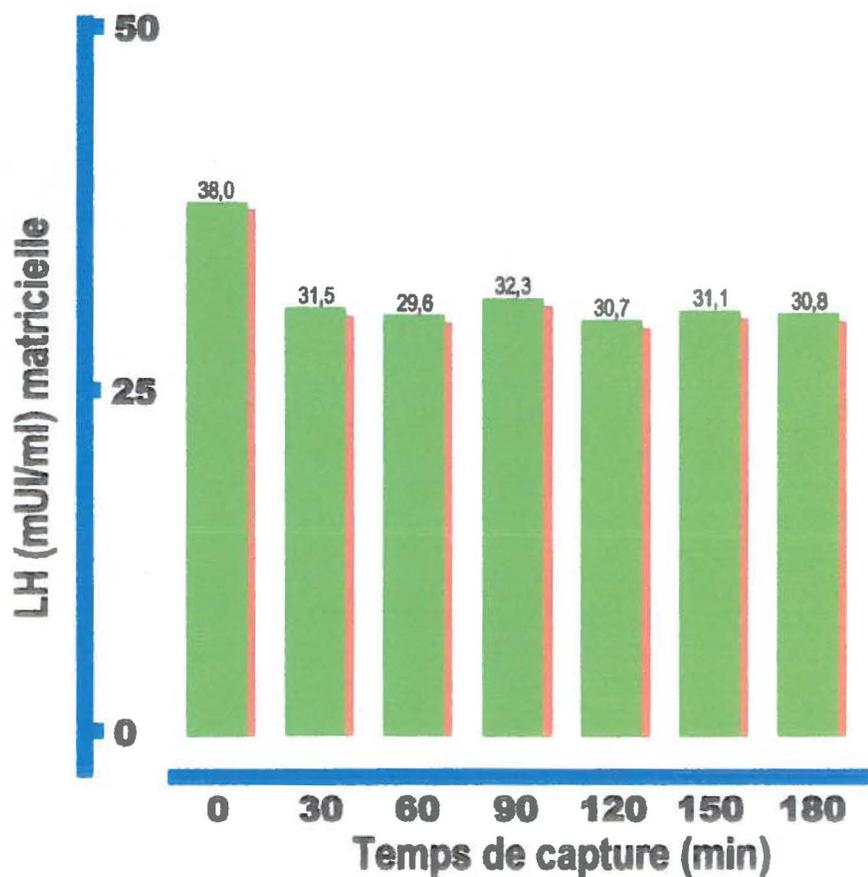
4.7 Chromatographie par immunoaffinité

Figure 6. Appauvrissement en LH urinaire tel que mesuré par le système analytique MAIA CLONE (Serono) après 180 minutes d'extraction par immuno-affinité en remplaçant, à chacun des temps indiqués, la bille (phase solide) porteuse d'anticorps monoclonaux anti-LH $_{\alpha\beta}$ par une nouvelle.

Comme indiqué à la Figure 6, l'essentiel de l'appauvrissement en LH survient dans les premières trente minutes d'exposition aux Mabs anti-LH $_{\alpha\beta}$ commercialisés par la firme CIBA (Allemagne), baisse telle que quantifiée dans le surnageant par le système analytique MAIA CLONE™ mis en marché par la firme Serono (Angleterre).

Toutefois, il semble bien que cette baisse initiale ne s'accroisse pas de manière sensible par le retrait du surnageant du complexe anticorps-antigène réalisé par le remplacement successif (à chacun des temps indiqués) des billes porteuses du Mabs anti-LH $_{\alpha\beta}$ constituant le système de capture de la trousse CIBA. En effet, après les différents remplacements, les valeurs de la lutropinurie semblent se maintenir en plateau, l'anticorps monoclonal anti-LH $_{\alpha\beta}$ apparaissant incapable d'extraire les antigènes toujours présents dans le surnageant, selon les mesures effectuées par le système MAIA CLONE.

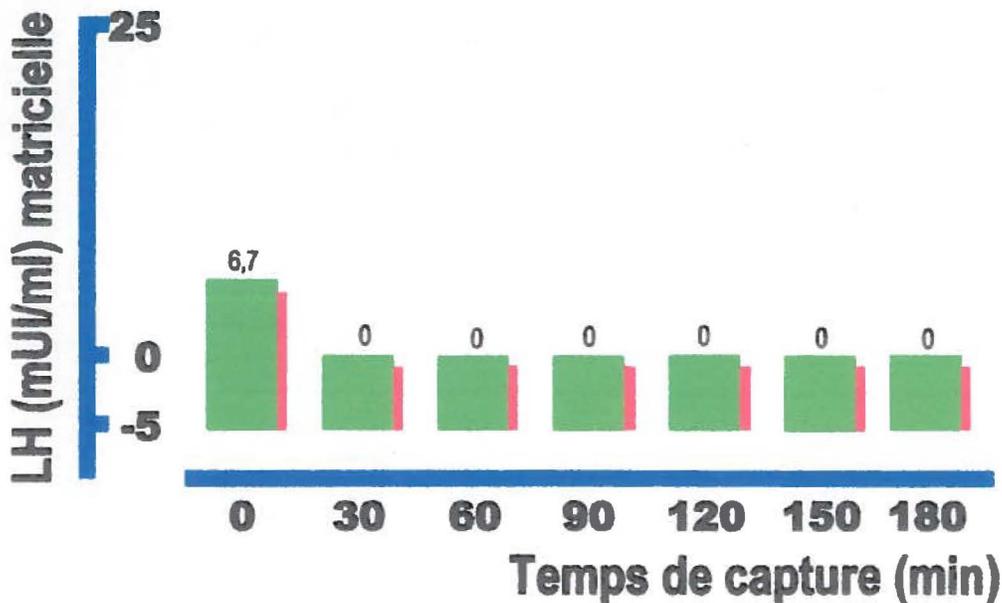


Figure 7. Appauvrissement en LH urinaire tel que mesuré par le système analytique commercialisé par la firme CIBA après 180 minutes d'extraction par immuno-affinité en déposant, à chacun des temps indiqués, une nouvelle bille (phase solide) porteuse d'anticorps monoclonaux anti-LH $_{\alpha\beta}$ commercialisés par la même firme pharmaceutique à titre d'anticorps de capture pour la LH.

La figure 7 ci-dessus présente des résultats plus que surprenants obtenus à la mesure d'un échantillon de chacun des surnageants urinaires aliquotés après exposition à l'anticorps de capture de la firme CIBA et quantifiés par cette même firme. Ainsi, après un premier 30 minutes d'exposition (anticorps-antigène), il ne reste plus de LH quantifiable dans les surnageant subséquents lorsque quantifié par CIBA.

4.8 Séparation par immunoaffinité

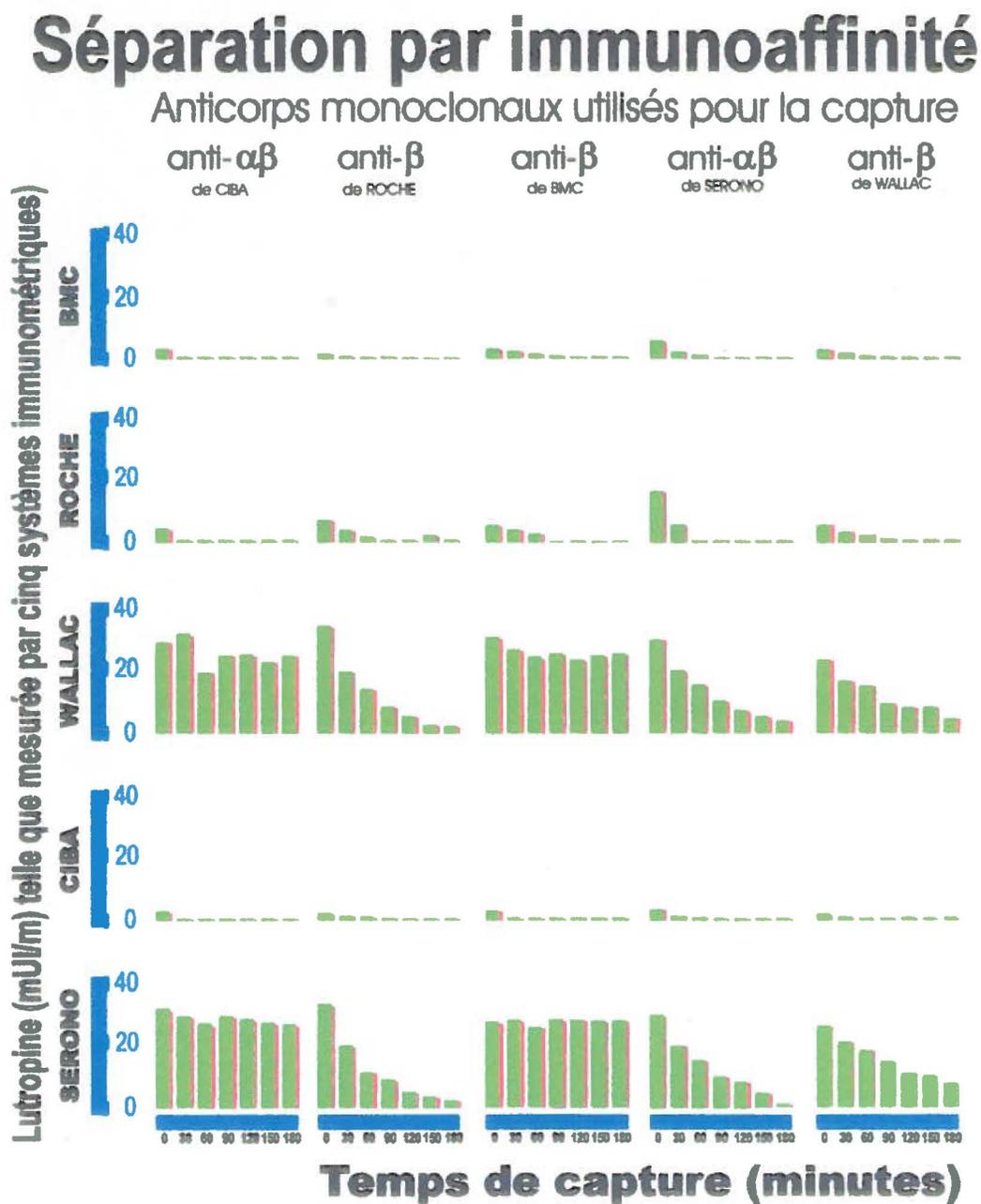


Figure 8. Valeurs de la LH dans un même échantillon soumis à une chromatographie d'affinité utilisant tour à tour chacun des anticorps monoclonaux anti-lutropine utilisés pour la capture antigénique dans chacune des cinq trousse commerciales, lesquelles furent tour à tour utilisées pour quantifier la LH restante après 0, 30, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes d'exposition, la charge d'anticorps extracteur étant renouvelée à chacun des temps précités.

Les résultats présentés dans cette figure (Figure 8) découlent du traitement d'une seule urine, une urine obtenue en période ovulatoire. Quoique les tableaux qui suivent décriront en détail les résultats esquissés à la Figure 8, cette dernière montre une vue d'ensemble de l'approche utilisée et des résultats obtenus. L'approche consista dans la soumission de cinq aliquots de ce même échantillon urinaire à une extraction séquentielle au moyen de chacun des cinq anticorps monoclonaux de capture vendus dans autant de trousse commerciales. La qualité et le fournisseur de chacun des ces anticorps monoclonaux sont inscrits en tête de tableau, alors que les systèmes "sandwichs" utilisés pour quantifier la LH dans le milieu apparaissent en ordonnée. Ainsi, les effets de la capture furent examinés par chacun des systèmes analytiques disponibles, ce qui procure une matrice de 25 séries de résultats. Contentons-nous, dans un premier temps de remarquer que deux systèmes analytiques se démarquent parmi les cinq étudiés : ceux mis en marché par les firmes Wallac et Serono. Le tableau qui suit examine plus en détails les résultats de la Figure 8, tout en ne retenant que les valeurs avant et après les expositions successives aux effets des différents anticorps extracteurs.

| Mabs d'extraction | Lutropinurie (mUI/ml) | | | | | |
|----------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|-------------|
| | Ciba ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Roche (β / α) | BMC ($\beta / \alpha\beta$) | Serono ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Wallac (β / β) | |
| anti- β | BMC | 3,0 → 1,0 | 5,0 → 0 | 4,0 → 1,0 | 27,0 → 27,0 | 32,0 → 25,0 |
| | Roche | 3,0 → 0,5 | 7,0 → 0 | 3,0 → 0 | 33,0 → 4,0 | 35,0 → 0 |
| | Wallac | 3,0 → 0,5 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0,5 | 26,0 → 7,0 | 25,0 → 6,0 |
| anti- $\alpha\beta$ | Ciba | 3,0 → 0 | 4,0 → 0 | 3,0 → 0 | 32,0 → 27,0 | 29,0 → 25,0 |
| | Serono | 3,5 → 0 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0 | 30,0 → 0 | 30,0 → 5,0 |

Tableau XIX. Valeurs de la lutropinurie telles que mesurées au moyen de cinq différents systèmes de titrations immunométriques avant (valeurs à gauche de la flèche) et après (valeurs à droite de la flèche) six périodes d'immuno-extraction de 60 minutes chacune. Les symboles α et β entre parenthèses veulent indiquer la qualité des paratopes des anticorps de capture et de marquage propres à chacun des systèmes analytiques utilisés.

Chapitre 5

Discussion

Les résultats à l'étude de la stabilité (tableau VI) pourrait-il s'expliquer par un bris des ponts thiols sur la molécule de LH à un pH élevé ? À l'ajout de tampon phosphate (étape nécessaire à l'application du protocole de Serono en milieu urinaire), certains de ces ponts pourraient s'être reformer de manières différentes, ne se rejoignant pas nécessairement au moyen des mêmes cystéines que celles retrouvées sur la molécule originale. Ce sont là des explications plausibles d'un spécialiste de la synthèse peptidique (Dr Alain Fournier, professeur titulaire IAF-INRS-Santé, communications personnelles).

La littérature pertinente permet de confirmer que généralement les mesures de la lutropinurie ne sont pas sensiblement modifiées lorsque effectuées entre des valeurs de pH variant entre 4,5 et 10,5 et une osmolarité oscillant entre 0,5 et 3,0 mOsm/Kg (Saketos et al., 1994). Il fut même décrit que les « meilleurs » pH permettant l'optimisation des valeurs de LH, mais par mesures radioimmunologiques (RIA), se retrouvaient dans la fenêtre de 7,0 à 8,5 (Van Ginkel et Loeber, 1985). De plus, les mesures de LH sérique et urinaire seraient assez bien corrélées, présentant un r (Pearson) de 0.94 ($p < 0.01$).

L'équilibre associatif est réversible entre la molécule intacte de LH et ses sous-unités α et β séparées. À titre d'exemple, à pH acide il se produit une certaine dissociation, alors qu'à pH approximatif de 5,3 et plus, la ré-association des deux sous-unités est favorisée (Pierce et Parson, 1981). En effet, une dissociation des deux sous-unités peut être conséquente à une baisse de pH, mais également à l'ajout d'un dénaturant et/ou à l'augmentation de la température du milieu.

Donc, si on acidifie le milieu pour favoriser l'élution, la LH pourrait se dissocier. Toutefois, lors d'un retour à un pH normal (physiologique), la molécule redeviendrait active. Par contre, il se pourrait qu'après ré-association, l'activité hormonale ne soit pas totalement récupérée (Pierce et Parsons, 1981). Donc, lors de l'acidification du milieu afin de favoriser l'élution, la lutropine pourrait se dissocier, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus lors de nos travaux en chromatographie d'affinité, épreuve à l'origine de nos questionnements sur le comportement de la molécule de LH à différents pH.

Pour conclure avec ce protocole sur la stabilité, que l'on pourrait qualifier de protocole-sentinelle, nous croyons qu'il faille retenir que les urines affichant un pH entre 4.5 et 10.5 ne devraient pas être modifiées dans leur teneur qualitative en LH. Restait donc à questionner plus à fond les effets de la congélation sur les molécules de LH.

Si les modifications les plus importantes de la congélation semblent se produire lors d'une première exposition au froid (tableau VII), il serait alors permis de croire que cette première congélation/décongélation soit à l'origine de différentes modifications au niveau des épitopes, exerçant possiblement un impact sur leur capacité à être reconnus par les anticorps monoclonaux utilisés. Il pourrait s'agir d'une dissociation sous-unitaire de certaines des molécules de LH, ce qui pourrait résulter en l'apparition dans le milieu d'un mélange de molécules de LH, soit des molécules intactes, des sous-unités β et/ou α libres, ou même des fragments de ces sous-unités, tout cela dans un milieu où, il ne faut jamais l'oublier, baignent des sous-unités libres de TSH, de FSH et, parfois, de hCG (Prentice et Ryan, 1975). Il est de plus loin d'être impensable de croire que ces cycles de congélation/décongélation puissent également affecter la qualité des arborisations oligosaccharidiques, lesquelles sont nécessaires à la reconnaissance épitopique par certains des anticorps monoclonaux anti-LH actuellement sur le marché (Saketos et al., 1994).

Une information obtenue directement des laboratoires européens de la firme Serono permet de confirmer que les anticorps monoclonaux utilisés dans leur trousse MAIA CLONE™ étaient de type épitopique discontinu, reconnaissant des épitopes dits plutôt conformationnels. De plus, les représentants de ladite firme nous soulignèrent l'importance des sucres arborisés pour le paratope de leurs anticorps.

Il est alors apparu des plus plausibles que la congélation puisse notamment exercer des effets dissociatifs sur les liens unissant les deux sous-unités de la LH, et/ou des effets déglycosylants, effets suffisants pour expliquer certains changements quantitatifs observés.

Certains travaux (Reimers et al., 1983; Livesey et Donald, 1982; Saketos et al., 1994) laissent croire en la possibilité de modifier la matrice urinaire pour permettre la préservation de l'intégrité des molécules y baignant. Si cela devait se confirmer, de telles modifications seraient des plus pertinentes dans un contexte analytique où obligation est faite de conserver les échantillons pour des périodes de temps relativement prolongées.

Sans aucun traitement préalable, la congélation pour une période de 24 heures exerça des effets très marqués sur les valeurs de la lutropinurie. En effet, lorsque comparée à celle conservée à 4°C, la teneur en LH dans les urines soumises à la seule congélation (Tableau VIII; traitement = aucun) était en moyenne plus faible de 30 % ($\Sigma = 175 \rightarrow 119$ mUI/mL), ce qui appuyait nos observations antérieures (Tableau VII) des effets de la congélation sur la mesure de la LH urinaire.

Le seul traitement au glycérol indique déjà une teneur plus faible de plus de 25% en LH, et ce avant toute congélation (Tableau VIII; $\Sigma = 175 \rightarrow 133$ mUI/mL). Ces effets à la baisse ne peuvent être attribués à un effet de dilution occasionné par l'ajout de glycérol, les quantités ajoutées étant minimales.

En plus d'affecter sensiblement la mesure de la lutropinurie, le glycérol semble incapable, dans nos conditions, de protéger les molécules des effets de la congélation, les lutropinuries s'affaissant davantage après exposition de 24 heures à une température de -17°C ($\Sigma = 133 \rightarrow 101$ mUI/mL, soit respectivement: $42 \rightarrow 33$; $35 \rightarrow 25$; $56 \rightarrow 43$ mUI/mL), le tout en contradiction avec les observations de Saketos et de ses collègues (1994), voulant que l'ajout du glycérol contre les effets de la congélation.

Tout comme le glycérol, une extraction à l'acétone ne semble pas offrir plus de protection aux molécules de LH dans le milieu urinaire. Comme décrit au tableau VIII, le seul fait d'extraire semble amputer de près de la moitié ($\Sigma = 175 \rightarrow 94$ mUI/mL) les quantités mesurables par le système analytique de Serono, alors que la congélation post-extraction retranche une autre fraction non négligeable ($\Sigma = 94 \rightarrow 77$ mUI/mL). Il faut ici souligner qu'en dépit de nombreuses tentatives, il demeurerait toujours une certaine quantité de LH dans le surnageant lors de l'extraction à l'acétone, et ce même après deux lavages, le surnageant devant être éliminé en faveur du culot (les mesures effectuées dans le surnageant lors d'une extraction à l'isopropanol donnaient des valeurs résiduelles beaucoup plus faibles que lors d'une extraction à l'acétone). Toutefois, les pertes ainsi observées ne peuvent expliquer les effets dramatiques de l'extraction sur les valeurs de la lutropinurie. De toute manière, une telle extraction ne semble pas offrir davantage de protection moléculaire qu'autrement. Les essais avec d'autres solvants d'extraction (isopropanol, éther, méthanol), en dépit souvent de résidus moindres dans les surnageants, ne furent pas concluants, les résultats étant comparables à ceux obtenus lors de l'utilisation de l'acétone.

Ainsi, selon le tableau VIII, l'utilisation de l'une ou l'autre de ces techniques d'extraction n'apparaissait pas concluante, l'extraction *per se* affectant la lutropinurie et son utilisation ne protégeant pas contre une congélation ultérieure. L'acidification, l'acétone ou l'isopropanol atteignent-ils la structure tridimensionnelle de la molécule ? Spéculation.

Le traitement à l'urée présente, quant à lui, des valeurs en LH pré et post congélation comparables. Ces observations laissent croire que les effets de l'urée pourraient se comparer à ceux de la congélation. Si, comme le souligne la littérature pertinente (Sakatos et al., 1994), l'urée modifie les liaisons non covalentes au niveau de la molécule, modifiant ainsi la configuration tridimensionnelle, les effets de la congélation pourraient alors se manifester par une dissociation sous-unitaire, diminuant ainsi la capacité de reconnaissance épitopique des anticorps discontinus utilisés, et expliquant plausiblement la quantification plus faible observée après congélation.

En ce qui concerne le tableau IX, selon la littérature (Livesey et Donald, 1982), l'albumine pourrait offrir une certaine protection contre les effets de la congélation, possiblement en assumant elle-même les affronts des bris moléculaires occasionnés par la rupture des ponts hydrogénés, en plus de diminuer les effets de l'adsorption sur les parois des récipients. En général, les ajouts matriciels de glycérol, d'urée, de PEG, de vitamine C tout comme l'extraction à l'acétone modifient à la baisse les valeurs de la LH urinaire.

En dépit de quelques écarts, de telles titrations basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux laissent croire que l'ajout d'acide ascorbique pourrait procurer une certaine protection contre les effets de la congélation. De manière globale, les pertes conséquentes à la congélation semblent de plus faibles importances en présence de vitamine C. Toutefois, et ce pour les mêmes raisons que lors de l'extraction à l'acétone, cette modification matricielle n'apparaît pas offrir les garanties recherchées et peut difficilement être retenue comme mode de protection en raison des pertes importantes occasionnées par sa seule addition à l'urine, et ce avant même toute congélation. Si l'ajout de faibles quantités de PEG à la matrice urinaire ne semble pas systématiquement préjudiciable à la quantification de la lutropinurie, la protection offerte lors de la congélation est apparue tout à fait insatisfaisante.

Ainsi, les résultats obtenus avant et après congélation, amènent à retenir l'albumine comme moyen de protection et à favoriser son incorporation (0,02g/mL) dans les protocoles ultérieurs d'immunotitration par systèmes immunométriques.

En effet, cet ajout matriciel 1) ne semblait pas interférer systématiquement avec les valeurs pré congélation et 2), semblait quand même offrir une certaine protection contre les effets de la congélation des échantillons.

L'utilisation d'anticorps polyclonaux (tableau X) laissait présager l'obtention de valeurs supérieures en LH en comparaison de celles obtenues par utilisation d'anticorps monoclonaux, cela en raison d'une moins grande sélectivité moléculaire propre aux anticorps polyclonaux. Ainsi, en raison de pertes engendrées par la congélation, découlant possiblement de phénomènes dissociatifs sous-unitaires, il était alors concevable de mesurer par ces anticorps une gamme plus étendue de molécules, quantifiant des sous-unités lutropinuriques libres et/ou associées, sans oublier des simi-molécules à la base des molécules de TSH, de FSH et/ou de hCG. Les quelques tentatives analytiques faites en utilisant des ajouts matriciels d'urée laissaient croire, en effet, que l'utilisation d'un anticorps polyclonal pourrait capter les sous-unités dissociées, les isohormones présentes ou même les fragments de LH, et ce, bien plus que pourrait le faire un anticorps de type monoclonal (Seth et al., 1995).

On constate que même sans aucun ajout matriciel et sans congélation, les quantités de LH mesurées par système analytique utilisant un anticorps monoclonal peuvent différer sensiblement de celles obtenues lorsque le système analytique utilise un anticorps polyclonal. Les raisons de cette disparité pourraient être multiples: entre autres, soulignons que les étalons utilisés dans chacun des deux systèmes analytiques étaient différents. Toutefois, pour certains échantillons, les écarts majeurs observés (souvent du double) ne peuvent être attribuables qu'à la grande sélectivité moléculaire des anticorps monoclonaux utilisés.

De plus, si la congélation entraîne une séparation des sous-unités de l'hormone, il n'apparaît pas des plus évidents que l'anticorps polyclonal utilisé soit capable de se lier à l'une ou l'autre des deux sous-unités, et cela aussi bien lorsqu'elles sont dissociées que lorsqu'elles ne le sont pas; ce constat découle de l'inspection des valeurs post-congélation, (tableau X), lesquelles sont majoritairement toutes plus faibles par mesures RIA.

Les effets d'un ajout d'urée n'aide pas plus à la compréhension; en effet, si on accepte que l'urée favorise la dissociation sous-unitaire de la molécule, la mesure quantitative ne semble pas améliorée par l'utilisation d'anticorps polyclonaux, pourtant décrits comme pouvant contenir un paratope se satisfaisant d'épitopes pouvant se situer sans chevauchement sur l'une ou l'autre des sous-unités. Ce raisonnement tient par contre difficilement si sont prises en compte les valeurs mesurées pour les échantillons # 1-2 et 5.

Quant à la vitamine C, elle semble associée à des pertes quantitatives de LH sans apporter une grande protection lors de la congélation. Pour sa part le PEG se comporte différemment selon que le système de titration est basé sur des anticorps monoclonaux ou des anticorps polyclonaux. En effet, en fonction du système analytique utilisé, la cryoprotection semble différente. Pour ce qui est de l'extraction à l'acétone, autant elle semblait un procédé bénéfique capable de contrer les effets de la congélation lorsque la LH était titrée par un monoclonal, autant les effets de la congélation sont présents (visualisés par une différence des quantités de LH pré et post-congélation) lors de la titration avec un polyclonal. Pour terminer, soulignons que les résultats obtenus sous traitement au glycérol ne semblent également pas des plus convainquants envers la capacité de cet alcool à assurer une protection moléculaire en situation de congélation. Il en va de même pour l'albumine lorsque associée à une titration en système polyclonal.

L'un des objectifs de ce travail voulait examiner les effets de différents ajouts matriciels dans le but de cibler lequel apporterait une meilleure protection aux effets néfastes de la congélation.

À la lumière des résultats présentés ci-dessus, il a semblé que l'ajout aux échantillons de faibles quantités d'albumine (0,02g/mL) pourrait être favorable. L'utilisation d'un système analytique polyclonal devait aider à la compréhension des effets de la congélation: il en fut difficilement ainsi. Il serait téméraire d'affirmer aujourd'hui que la congélation ne fait que dissocier la molécule de lutropine en ses sous-unités. Si, comme le soutient le fournisseur du système analytique polyclonal (ICN), les anticorps polyclonaux peuvent s'associer aux sous-unités libres, la congélation provoquerait d'autres modifications moléculaires qui demeurent à être identifiées. Quelle qu'en soit la nature, l'albumine semble tout au moins capable d'atténuer ces modifications conséquentes à la congélation.

En corollaire, et pour notre propre satisfaction, un protocole sur HPLC fut effectué dans le but d'examiner si la lutropine après congélation était effectivement subdivisée en ses deux sous-unités. Afin de bien cibler les paramètres d'élution, une élution fut en premier lieu réalisée en utilisant du Pergonal™ (Serono), une solution comprenant 75 UI de FSH, 75 UI de LH et 10 mg de lactose par ampoule de 2 mL. La colonne choisie fut une C₁₈ à phase inversée (ODS) avec une solution A à 100% de tampon phosphate (NaH₂ PO₄·H₂O) et une solution B comprenant 50% de MeCN et 50% Na₂HPO₄. Le volume d'injection était de 25µL et lu à une longueur de 280 nm. La résolution obtenue était satisfaisante.

Toutefois, le lactose présent procura un bruit de fond si important qu'il ne permit pas de cibler les pics de LH et FSH. Avec le même acharnement, une nouvelle tentative fut réalisée mais en utilisant du hCG obtenu d'urines de femmes enceintes (Sigma, St. Louis, USA) : les résultats ne furent pas plus convaincants, ne fournissant aucune indication particulière sur le statut de la dissociation des hormones en ses sous-unités. Plus précisément, le pic de hCG fut ciblé, mais il demeurerait impossible de confirmer la présence des sous-unités α et β libres. Ces expériences furent abandonnées, d'autres voies plus intéressantes à explorer se présentant.

Confrontée à tant d'hétérogénéité, et bien que les matrices urinaires puissent possiblement être en cause, et ce à la lumière des informations fournies par la firme Serono et précisant que leurs trousses sont calibrées et conçues pour des mesures en milieu sérique, nous ne pouvions que conclure que les raisons de ces disparités devraient plutôt être associées à la structure moléculaire même. Puisque certaines urines répondent bien aux différents traitements, tandis que d'autres se comportent atypiquement, se pourrait-il que chaque isohormone se distingue dans sa capacité à se lier à l'anticorps ?

En effet, il est permis de croire en l'incapacité des anticorps de Serono à reconnaître l'épitope contre lequel ils sont dirigés, sachant qu'il y a une myriade d'isohormones, comme nous en avons discuté au chapitre premier de ce travail. Les anticorps utilisés par ladite trousse de Serono étant discontinus et calibrés à l'aide d'urine de femmes post-ménopausées, ils sont peut-être trop spécifiques, incapables de reconnaître l'ensemble des formes que peuvent prendre les molécules de nos échantillons de lutropine urinaire.

Possiblement moins sélective, la trousse IRMA en raison d'une capture moins spécifique, nous donne des résultats généralement supérieurs à ceux obtenus par IFMA (Tableau XIII). Sans jamais oublier un biais possible en raison de l'étalonnage différent des deux trousses utilisées, il semble en effet que la capture par mAbs anti- β (trousse IFMA) soit plus sélective que la capture par mAbs anti- $\alpha\beta$ (trousse IRMA), laissant ainsi croire en la présence de valeurs faussement positives par Serono. Cette impression pourrait être confirmée à l'examen des résultats sous traitement à l'albumine : ces ajouts semblent indiquer la présence de liaisons non-spécifiques chez Serono (IRMA), les valeurs étant généralement plus élevées (colonne blanche à chiffres violets: + 77% en moyenne) lorsque le système analytique capture les antigènes avec un mAbs anti- $\alpha\beta$.

L'examen des seuls résultats en analyse IRMA aurait pu laisser croire en une amélioration de la liaison anticorps-antigène en présence d'albumine; si cela était la règle, l'amélioration aurait dû se lire également en analyses IFMA.

L'examen des résultats (chiffres jaunes sur fond vert) indique également que le système sandwich anti- β /anti- β (IFMA) serait plus sensible aux effets de la congélation que le système anti- $\alpha\beta$ /anti- β (IRMA).

Si un traitement à l'urée ne faisait que favoriser la dissociation des doublets lutropiques en ses sous-unités α et β , l'utilisation d'un capteur anti- $\alpha\beta$ (Serono) aurait dû s'avérer totalement inefficace mais plutôt favorable à l'utilisation d'un capteur moléculaire de type anti- β (Wallac). L'examen des résultats ne confirme pas une telle action privilégiée de l'urée sur la LH : la tendance indiquerait des valeurs plus élevées avec la trousse Serono qu'avec la trousse Wallac (chiffres rouges). L'augmentation de la molarité de la préparation d'urée ne fait qu'amplifier les résultats, ne permettant pas une interprétation différente.

Considérant la capacité du premier à capturer les sous-unités, qu'elles soient ou non associées aux sous-unités α , et cela contrairement au système IRMA, ces résultats ne plaident pas en faveur d'un effet dissociatif sous-unitaire privilégié lors de la congélation des échantillons. Si cela était, la capacité de capture du système IRMA aurait été moindre. La congélation aurait-elle des effets conformationnels indépendants de ceux liés à l'association sous-unitaire?

Nous nous sommes aussi interrogés sur la qualité de la LH en période ovulatoire, croyant ici que le système sandwich anti- β /anti- β pouvait possiblement mesurer des isoformes que le système sandwich anti- $\alpha\beta$ /anti- β ignorait, cela pour expliquer une valeur de 161,1 mUI/ml en IFMA contre une de 150,7 en IRMA (Tableau XIII).

Un rapide coup d'œil (Tableau XIV) laisse possiblement entrevoir des modifications dans les proportions d'isoformes au cours du cycle. Quoique les évidences soient minces, elles pourraient être compatibles avec certaines indications de la littérature que la LH est moins bioactive en période post-ovulatoire (Wilson, Leigh et Chapman, 1990; Pigny et al., 1992; Wide et Naessén, 1994), dotée d'arborisations glycosidiques différentes, auxquelles sont sensibles les paratopes des mAbs utilisés par la firme Serono.

À titre indicatif, il faut mentionner qu'une vérification de l'échantillon urinaire prélevé au pic ovulatoire fut effectuée après conservation pour une période de 12 heures à 4°C. Les analyses ont montré une diminution de la concentration en LH par Serono (96.1 à 91.6 UI/L) mais une augmentation par Wallac (84.0 à 97.1 UI/L). Avec toute la prudence nécessaire, ces observations portent à croire que les deux systèmes analytiques ne mesurent pas nécessairement les mêmes isoformes.

Avec toute la prudence de mise en raison de l'examen d'un sujet unique, mais toutefois conscient que nous utilisons deux outils analytiques dont l'erreur de précision n'excède pas les 5%, les résultats de ce coup d'œil sur les mictions quotidiennes (Tableau XV) nous laissent croire en une fluctuation de la qualité des isoformes lutropiques en fonction de la journée, du moins chez le sujet étudié. Autrement dit, ces quelques données suggèrent que le système analytique Serono mesure des espèces moléculaires «nocturnes» de LH qui ne sont pas mesurées par le système commercialisé par la firme Wallac.

D'après le tableau XVI, il est périlleux d'affirmer que nous sommes en présence de populations différentes de LH. Toutefois, certaines données laissent croire qu'il pourrait en être possiblement ainsi. En effet, un examen comparatif des résultats (voir chiffres blancs sur fond coloré) laisse croire que le système sandwich anti- β / anti- β (IFMA) ne lit pas exactement la même chose que le système sandwich anti- $\alpha\beta$ / anti- β (IRMA) pour la cohorte la plus âgée. Les lectures systématiquement plus élevées en IRMA pourraient découler de la capture par ce dernier système d'un ou d'isoformes non reconnus par le système IFMA. N'eut été du sujet #2, les valeurs corrigées auraient appuyé cette tendance.

Les valeurs lutropinuriques systématiquement moins élevées chez la cohorte la plus âgée seraient-elles plus le reflet d'une incapacité des différents systèmes analytiques à mesurer la présence d'isoformes particuliers plutôt que le reflet d'une diminution quantitative réelle de la lutropinurie?

Cela ne serait pas nécessairement incohérent avec les données de Zwart et collaborateurs (1996) voulant que la lutropinémie des sujets mâles âgés soit plus sialisée, ce qui lui octroie une demi-vie plus longue et une épuration moins rapide. Le tout revient encore à la capacité d'appréciation de la qualité des molécules de LH plutôt qu'à leurs simples quantifications.

L'ajout de neuraminidase permet d'enlever les molécules d'acide sialique sur la protéine. L'examen des résultats pourrait nous laisser croire que les deux systèmes analytiques ont tendance à mesurer plus de LH lorsque l'on retire l'acide sialique (cf. Tableau XVII, colonnes vertes à chiffres blancs); aussi faudrait-il être prudent lorsque l'on affirme que la lutropinurie des moins âgés est plus élevée que celle des individus plus âgés.

Le tableau XVIII semblent également indiquer que la neuraminidase pourrait jouer un rôle cryoprotecteur puisque les pertes sont moins prononcées lorsque les échantillons sont préalablement traités à la neuraminidase. Le fait d'ajouter la neuraminidase pourrait améliorer les lectures obtenues, ce qui permet de croire que l'enzyme exerce une certaine protection de la protéine lors l'incubation à 37°C ainsi que lors de la congélation à -17°C pendant 6 jours. Plus on enlève d'acide sialique, moins la protéine serait vulnérable au traitement à 37°C et à la congélation. On peut ainsi supposer que la congélation affecte l'acide sialique des glycoprotéines. On pourrait également déduire que l'acide sialique n'est pas essentiel à la reconnaissance épitope-paratope.

Plusieurs interprétations peuvent être avancées à titre d'explication de ces résultats. La plus évidente implique une explication en regard de la loi d'action de masse (Figure 4). En effet, la baisse rapide de la LH urinaire dans les premières trente minutes pourrait s'expliquer par la présence d'un excès d'anticorps favorable à la formation accélérée du complexe anticorps-antigène (AcAg), donc une réaction où la constante d'association k_1 présenterait une valeur supérieure à celle de la constante de dissociation k_2 ($k_1 \gg k_2$). Après 30 minutes ou quelque d'exposition, la formation d'un plateau pourrait s'expliquer par l'apparition d'une situation d'équilibre entre les constantes k_1 et k_2 .

La mesure (par système Serono) des molécules résiduelles de LH dans la matrice urinaire semble indiquer que le retrait du complexe AgAc formé et son remplacement par de nouveaux Mabs libres n'exerce que peu d'effets, la réaction vers la droite et le retrait des antigènes par formation du complexe AgAc apparaissant non significatifs.

Mais, pourquoi un tel arrêt dans l'extraction? Qu'est-ce qui empêcherait la formation du complexe anticorps-antigène alors que le milieu est enrichi successivement en anticorps libres et que la mesure de la lutropinurie par système MAIA CLONE™ indique toujours la présence de quantités substantielles de LH dans le milieu urinaire étudié? Le retrait du complexe AgAc du milieu ne permettait pas véritablement de croire que la constante de dissociation k_2 pouvait atteindre des valeurs comparables à celles de la constante d'association k_1 .

Il faut ici mentionner que nous voulions bien croire que l'anticorps de capture commercialisé par la firme CIBA ne reconnaissait que certaines molécules de LH qu'il s'empressait de retirer du surnageant en les complexant. Ainsi, dans le surnageant ne devait demeurer aucune molécule de LH selon CIBA, expliquant alors son incapacité à en retirer davantage, du moins celles que Serono y voyait toujours. Les résultats de cette vérification furent interprétés comme indicateurs de glycoformes, levant une partie du voile des ambiguïtés constatées antérieurement. Dans les deux systèmes analytiques utilisés, pourtant réputés être hautement spécifiques envers la LH, comment ne pas voir que les deux systèmes à base d'anticorps monoclonaux dirigés contre la LH mesurent des molécules différentes?

L'échantillon urinaire avant immuno-extraction s'avère contenir 38,0 mUI/ml de LH lorsque mesuré par le système MAIA CLONE™ de Serono (Figure 6) alors que, selon le système analytique commercialisé par CIBA ce même échantillon n'en contiendrait que 6,7 mUI/ml (Figure 7). Après trente minutes d'immuno-extraction, le système CIBA indique qu'il ne reste plus aucune quantité mesurable de LH dans le milieu (Figure 7), alors que le système Serono indique qu'il reste toujours 31,5 mUI/ml (Figure 6).

L'interprétation la plus plausible qui fut faite de ces observations fut comme mentionnée : dans l'échantillon, l'anticorps monoclonal anti-LH $_{\alpha\beta}$ (CIBA) reconnaît (Figure 7, 1^e colonne) et retire en trente minutes (Figure 7, 2^e colonne) une espèce moléculaire de LH, une isohormone, dont la quantité représente approximativement 7 mUI/ml.

Les tentatives successives ultérieures immuno-extraction se sont avérées inutiles (Figure 7, 3^e colonne et plus), la totalité de l'isohormone concernée ayant été captée et extraite dans les premières trente minutes d'exposition au Mabs de CIBA.

C'est ce que montre également les résultats exprimés à la Figure 6; ils indiquent en effet que le système MAIA CLONE™ de Serono est capable de reconnaître l'isohormone extraite par le Mabs de CIBA (Figure 7), soit environ 7 mUI/ml, plus une trentaine d'autres molécules constituant des isohormones différentes et non reconnues par le Mabs de CIBA, pour une quantité totale de 38 mUI/ml (Figure 6). immuno-extraction au moyen du Mabs de la firme CIBA retire totalement l'isohormone reconnu dans les premières trente minutes, ce que semble indiquer les deux plateaux observés aux figures 6 et 7. Cette utilisation croisée d'anticorps anti-LH semblait enfin révéler concrètement l'existence des isohormones de la LH.

Plusieurs informations des plus intéressantes se dégagent des données présentées au Tableau XIX :

Premier constat :

Comme nous pouvions visuellement l'entrevoir à la figure 8, la mesure immunométrique de la LH urinaire dans une même miction indique que les cinq trousseaux étudiées se regroupent en deux groupes (Tableau XX): celles qui ne reconnaissent que de faibles concentrations en LH (chiffres blancs sur trame marron), et celles qui mesurent des valeurs près de dix fois supérieures dans la même urine (chiffres blancs sur trame fuchsia);

| Mabs d'extraction | | Lutropinurie (mUI/ml) | | | | |
|----------------------|--------|---|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|
| | | Ciba ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Roche (β / α) | BMC ($\beta / \alpha\beta$) | Serono ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Wallac (β / β) |
| Anti- β | BMC | 3,0 → 1,0 | 5,0 → 0 | 4,0 → 1,0 | 27,0 → 27,0 | 32,0 → 25,0 |
| | Roche | 3,0 → 0,5 | 7,0 → 0 | 3,0 → 0 | 33,0 → 4,0 | 35,0 → 0 |
| | Wallac | 3,0 → 0,5 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0,5 | 26,0 → 7,0 | 25,0 → 6,0 |
| Anti- $\alpha\beta$ | Ciba | 3,0 → 0 | 4,0 → 0 | 3,0 → 0 | 32,0 → 27,0 | 29,0 → 25,0 |
| | Serono | 3,5 → 0 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0 | 30,0 → 0 | 30,0 → 5,0 |

Tableau XX. Modification de la présentation faite au Tableau XIX mettant en relief la quantification sensiblement plus faible (chiffres blancs du bloc marron) de la lutropinurie faites par trois trousse commerciales (Ciba, Roche et BMC) sur un même échantillon comparativement aux trousse commerciales de Serono et de Wallac (chiffres blancs du bloc fuchsia).

Deuxième constat :

L'extraction par immuno-affinité utilisant trois différents Mabs anti-LH dirigés spécifiquement contre la sous-unité β indique que seul l'anticorps monoclonal commercialisé par la firme Roche (trame en relief) est capable d'extraire la LH urinaire, extractions telles qu'appréciées par chacune des cinq trousse immunométriques (Tableau XXI). En effet, l'ensemble des cinq trousse commerciales indique qu'il ne reste que peu ou pas de LH dans l'échantillon urinaire lorsque l'extraction est effectuée au moyen de l'anticorps de capture commercialisé par la firme ROCHE de Suisse, un anticorps anti-LH β .

| Mabs d'extraction | | Lutropinurie (mUI/ml) | | | | |
|----------------------|--------|---|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|
| | | Ciba ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Roche (β / α) | BMC ($\beta / \alpha\beta$) | Serono ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Wallac (β / β) |
| anti- β | BMC | 3,0 → 1,0 | 5,0 → 0 | 4,0 → 1,0 | 27,0 → 27,0 | 32, → 25,0 |
| | Roche | 3,0 → 0,5 | 7,0 → 0 | 3,0 → 0 | 33,0 → 4,0 | 35,0 → 0 |
| | Wallac | 3,0 → 0,5 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0,5 | 26,0 → 7,0 | 25,0 → 6,0 |
| anti- $\alpha\beta$ | Ciba | 3,0 → 0 | 4,0 → 0 | 3,0 → 0 | 32,0 → 7,0 | 29,0 → 5,0 |
| | Serono | 3,5 → 0 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0 | 30,0 → 0 | 30,0 → 5,0 |

Tableau XXI. Modification de la présentation faite au Tableau XIX mettant en relief la capacité particulière d'extraction (de capture) de l'anticorps monoclonal de la firme Roche (trame en relief), capacité appréciée par l'ensemble des cinq trousses utilisées pour mesurer la lutropinurie.

Troisième constat :

L'extraction par utilisation de l'anticorps monoclonal anti- β de la firme allemande BMC (Tableau XXII, trame en relief) indique que cet anticorps, pourtant hautement spécifique, a la propriété d'extraire de l'urine les seules espèces de LH reconnues par les systèmes analytiques des trousses immunométriques des firmes Ciba, Roche et BMC. En effet, selon la mesure qu'en fait le système analytique de Serono, aucune molécule de LH n'aurait été extraite de la matrice urinaire, alors que le système analytique DELPHIA de Wallac semble sensible à la disparition de cet isohormone de l'échantillon urinaire.

| Mabs d'extraction | Lutropinurie (mUI/ml) | | | | | |
|----------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|-------------|
| | Ciba ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Roche (β / α) | BMC ($\beta / \alpha\beta$) | Serono ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Wallac (β / β) | |
| anti- β | BMC | 3,0 → 1,0 | 5,0 → 0 | 4,0 → 1,0 | 27,0 → 27,0 | 32,0 → 25,0 |
| | Roche | 3,0 → 0,5 | 7,0 → 0 | 3,0 → 0 | 33,0 → 4,0 | 35,0 → 0 |
| | Wallac | 3,0 → 0,5 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0,5 | 26,0 → 7,0 | 25,0 → 6,0 |
| anti- $\alpha\beta$ | Ciba | 3,0 → 0 | 4,0 → 0 | 3,0 → 0 | 32,0 → 27,0 | 29,0 → 25,0 |
| | Serono | 3,5 → 0 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0 | 30,0 → 0 | 30,0 → 5,0 |

Tableau XXII. Modification de la présentation faite au Tableau XIX mettant en relief la capacité sélective d'extraction (de capture) de l'anticorps monoclonal de la firme BMC (trame en relief).

Quatrième constat :

L'extraction par utilisation des valeurs résiduelles de LH urinaire (Tableau XXIII, trame en relief) telles que mesurées par les trousse Serono et Wallac suite à l'extraction par immuno-affinité utilisant l'anticorps monoclonal anti- β (Wallac) pourrait s'expliquer par une cinétique d'extraction plus lente ;

| Mabs d'extraction | Lutropinurie (mUI/ml) | | | | | |
|----------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|-------------|
| | Ciba ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Roche (β / α) | BMC ($\beta / \alpha\beta$) | Serono ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Wallac (β / β) | |
| anti- β | BMC | 3,0 → 1,0 | 5,0 → 0 | 4,0 → 1,0 | 27,0 → 27,0 | 32,0 → 25,0 |
| | Roche | 3,0 → 0,5 | 7,0 → 0 | 3,0 → 0 | 33,0 → 4,0 | 35,0 → 0 |
| | Wallac | 3,0 → 0,5 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0,5 | 26,0 → 7,0 | 25,0 → 6,0 |
| anti- $\alpha\beta$ | Ciba | 3,0 → 0 | 4,0 → 0 | 3,0 → 0 | 32,0 → 27,0 | 29,0 → 25,0 |
| | Serono | 3,5 → 0 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0 | 30,0 → 0 | 30,0 → 5,0 |

Tableau XXIII. Présentation identique à celle du Tableau XIX mais mettant en relief (trame en relief) la mesure par les trousse de Serono et de Wallac de valeurs résiduelles de LH après les extractions successives au moyen du Mabs anti- β de la firme Wallac.

Cinquième constat :

L'extraction par utilisation de Mabs anti-LH dirigés contre les deux sous-unités α et β de la molécule semble indiquer que ces deux anticorps monoclonaux sont différents (Tableau XIV, trame en relief). En effet, il apparaît que ces deux Mabs ont la capacité d'extraire l'ensemble des isoformes reconnus et mesurés par les trousse des firmes Ciba, Roche et BMC mais différent dans leur capacité à extraire l'ensemble des espèces moléculaires reconnues par les systèmes analytiques des firmes Serono et Wallac.

| Mabs d'extraction | Lutropinurie (mUI/ml) | | | | | |
|----------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------|-------------|
| | Ciba ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Roche (β / α) | BMC ($\beta / \alpha\beta$) | Serono ($\alpha\beta / \alpha\beta$) | Wallac (β / β) | |
| anti- β | BMC | 3,0 → 1,0 | 5,0 → 0 | 4,0 → 1,0 | 27,0 → 27,0 | 32,0 → 25,0 |
| | Roche | 3,0 → 0,5 | 7,0 → 0 | 3,0 → 0 | 33,0 → 4,0 | 35,0 → 0 |
| | Wallac | 3,0 → 0,5 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0,5 | 26,0 → 7,0 | 25,0 → 6,0 |
| anti- $\alpha\beta$ | Ciba | 3,0 → 0 | 4,0 → 0 | 3,0 → 0 | 32,0 → 27,0 | 29,0 → 25,0 |
| | Serono | 3,5 → 0 | 6,0 → 0 | 3,0 → 0 | 30,0 → 0 | 30,0 → 5,0 |

Tableau XXIV. Présentation identique à celle du Tableau XIX mais mettant en relief (trame en relief) les propriétés différentes d'extraction du Mabs anti- $\alpha\beta$ de la firme CIBA.

Force est donc de constater que l'extraction de la LH urinaire à partir d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la sous-unité β ou même tout aussi spécifiquement contre la molécule intégrale (anti- $\alpha\beta$) laisse transparaître une hétérogénéité entre les Mabs. On peut facilement concevoir que la production d'anticorps monoclonaux est tributaire de l'antigène utilisé et, connaissant l'existence d'isoformes ou de glycoformes pour la LH, une telle hétérogénéité n'est pas complètement surprenante. De plus, l'utilisation d'un même anticorps monoclonal dans un système d'extraction par affinité démontre la présence dans l'urine, du moins dans celle utilisée, de différentes espèces moléculaires de LH.

La mise en marché de différentes trousse pour la mesure de la LH conduit donc, comme nous pouvons le constater, à l'obtention de valeurs qui peuvent être bien différentes, ce qui n'est rien pour augmenter le niveau de confiance envers la qualité du matériel mis en marché par certaines compagnies.

Pour être plus rigoureux, il faut souligner que les observations qui se dégagent de notre étude valent plus particulièrement pour l'échantillon d'urine utilisé dans l'étude, c'est-à-dire un échantillon prélevé au pic de LH précédant l'ovulation. Nous croyons qu'il

aurait pu en être autrement avec des échantillons prélevés à d'autres moments du cycle ou à d'autres périodes de la vie. Toutefois, cet échantillon particulier n'infirme en rien par son unicité les observations faites des divergences surprenantes entre les différentes trouses toutes prétendant mesurer la LH.

Chapitre 6

Conclusion

En introduction, nous avons soulevé le constat d'incapacité à réconcilier les enseignements classiques de la physiologie d'une relation étroite entre les niveaux circulants de testostérone et ceux de LH. À titre de prétexte, nous avons considéré l'inadéquation entre les mesures de la lutropinurie et la testostéronurie chez des athlètes réputés abuseurs de testostérone à des fins ergogéniques.

Théoriquement, une élévation des niveaux de testostérone dans le torrent circulatoire devrait se traduire par un effet inhibiteur sur la synthèse et le largage hypophysaire de la LH. La revue de la littérature présentée en a établi la relation. Un tel effet de rétrocontrôle sur la LH aurait pu s'avérer intéressant dans l'établissement d'une sonde secondaire permettant le dépistage des abuseurs de testostérone. En effet, considérant qu'une hyperstestostéronémie, quelle soit d'origine endogène ou exogène, entraîne une hypolutropinémie et, éventuellement, une hypolutropinurie, l'élévation d'un indicateur exprimant le rapport T / LH pouvait être considérée comme révélateur d'une prise exogène de testostérone par certains athlètes. Un tel rapport aurait pu à l'occasion conforter celui retenu officiellement par le Comité Olympique International, le rapport T / E, rapport susceptible de manipulations.

Quoique moins documentés, nous aurions pu utiliser comme prétexte les difficultés rencontrées en milieux cliniques dans la mesure des gonado-stimulines, principalement chez les enfants. En effet, des discussions avec les intervenants de ces milieux nous ont indiqué que depuis l'avènement des anticorps monoclonaux, il devenait difficile d'établir la lutropinémie chez les pré- et péri-pubertaires, les valeurs obtenues cadrant difficilement avec les diagnostics établis.

La revue de littérature effectuée lors de ce mémoire a voulu mettre l'accent sur la physiologie fine présidant aux activités afférentes à la LH. Elle a mis en évidence l'étroite surveillance entourant l'activité des cellules gonadotropes hypophysaires, une démonstration implicite de l'importance d'un largage minutieusement contrôlé de la stimuline dans la circulation. Cette mécanique précise de largage révèle toutefois une inadéquation entre elle et le faible nombre de situations physiologiques où nous savons les niveaux de LH soumis à de fortes fluctuations. Nous pensons ici à trois situations particulières, trois périodes importantes étroitement liées avec la fertilité de l'espèce: les oscillations nocturnes des gonado-stimulines de la pubarche qui mèneront vers la ménarche, le pic ovulatoire de LH, l'élévation de la lutropinémie à la ménopause en réponse à un ovaire défaillant.

La littérature présentée a surtout mis l'accent sur les qualités de la molécule de LH synthétisée, voulant ainsi entraîner le lecteur sur la piste des isoformes de la LH. Cette littérature a montré la grande similitude existant entre les sous-unités α des différentes stimulines hypophysaires, qu'il s'agisse de la LH, de la FSH ou de la TSH, tout en soulignant l'importance des sous-unités β dans l'octroi de personnalités hormonales distinctes. Cette littérature s'est surtout attardée non pas à la fraction protéique de la LH mais plutôt à sa fraction saccharidique.

Avec beaucoup d'emphase, nous avons examiné l'arborisation de cette glycoprotéine, la qualité de ses sucres et l'importance qu'il pouvait revêtré dans la reconnaissance de la cible et la transmission du signal approprié.

Nous avons relevé dans la littérature les études s'intéressant aux conformations plus acides que basiques de ces sucres et leurs importances fonctionnelles. Cette gymnastique bien particulière voulait dans sa finalité attirer l'attention du lecteur sur la capacité de l'organisme à mettre en circulation des LH avec des configurations bien différentes aux niveaux des arborisations sucrées, l'existence de multiples glycoformes de la LH.

Ces démonstrations faites, nous avons alors examiné la LH sous un angle plus antigénique, dans sa capacité à induire la formation d'anticorps. Des dichotomies sont vite apparues lorsque des systèmes radioimmunologiques furent comparés à des systèmes biologiques. Un examen plus approfondi de l'étalonnage des préparations de LH a permis de constater que la préparation des LH à des fins antigéniques passait par la banalisation des arborisations, ces dernières se dépouillant de leur personnalité propre lors des traitements de purifications préalables à l'obtention de LH prêtes pour injections à des fins de production d'anticorps anti-LH.

L'hypothèse formulée prenait en considération ces éléments et s'appuyait sur le fait que les anticorps ainsi obtenus et commercialisés pouvaient possiblement s'avérer inadéquats, du moins partiellement, à bien évaluer les molécules de LH car présentant à l'analyse immunométrique des épitopes possiblement bien différents des paratopes lutropiques commercialisés.

Mais alors, comment mettre en évidence tous ces concepts livrés par la littérature en pièces plus ou moins détachées et rassemblées ici pour satisfaire nos besoins d'explications d'un constat pourtant bien réel, celui chez certains athètes convaincus de dopage de l'inadéquation entre les valeurs de la testostérone (mesurée par techniques chimiques; GC-MS) et celles de la LH appréciées par mesures immunométriques.

Une première série de protocoles fut exécutée dans le but de cerner certaines influences liées à la manipulation, à la préparation et à la conservation des échantillons urinaires. Pour ne pas distraire le lecteur, nous avons conservé dans le corpus du mémoire que les protocoles qui nous apparaissent les plus significatifs, ceux montrant la limite des principales trouses commerciales anti-LH face à l'existence des glycoformes. Utilisant un stratagème que nous aimons à qualifier d'original, nous avons utilisé à tour de rôle sur une même urine riche en LH (urine d'ovulation) les anticorps anti-LH utilisés dans les cinq différentes trouses pour la capture de l'antigène furent confrontés dans la quantification de la LH.

Il nous apparaîtrait pertinent d'examiner le comportement de ces anticorps et de ces trousses sur des échantillons variés: ce pourrait être là une voie de recherche des plus prometteuses. Notre raisonnement, quoique partiellement spéculatif, se base sur un ensemble de facteurs qui demandent toutefois à être vérifiés. À titre d'exemple, se pourrait-il que la qualité de la LH sécrétée pour l'induction de l'ovulation soit différente de celle mesurée à l'installation de la ménopause? Cette dernière molécule serait-elle moins efficace dans sa liaison avec son récepteur ovarien à la fin (ou au début) du cycle de reproduction de la femme? La défaillance ovarienne associée à la ménopause serait-elle, en partie du moins, associée à une modification « isoformique » de la LH? L'aménorrhée ou l'oligoménorrhée associée à l'anorexie nerveuse serait-elle en partie explicable par des changements conformationnels et / ou des changements dans la glycosylation de la LH? À concentration égale, la qualité de la LH mesurée chez un homme mûr serait-elle différente de celle mesurée chez un jeune adulte de 20 ans? L'initiation des oscillations de la LH associées aux premières stimulations gonadiques (gonadarche) chez le pré-pubère ne cacherait-elle pas aussi des modifications structurales de la LH qui amélioreraient l'affinité ligand-récepteur ou la transmission du signal post-ancrage?

Ce sont là des interrogations bien légitimes qui pourraient être posées et que, croyons-nous, devraient être explorées. Elles sous-entendent que le type de trousses immunométrique actuellement sur le marché pourrait s'avérer, dans l'état actuel de leur composition, inadéquat pour l'évaluation de la LH sérique et/ou urinaire de ces différentes situations physiologiques. Les différences énormes observées entre les trousses utilisées dans notre étude qui sont, il faut bien le souligner, d'utilisation courante en milieux cliniques, suscitent sinon des craintes pour le moins un fort questionnement.

Nous pourrions souhaiter que les laboratoires cliniques puissent éventuellement disposer de trousses plus polyvalentes, capables d'évaluer avec précision les valeurs de la LH présente dans le liquide analysé. Cela sera possible lorsque la qualité de la LH aura été bien établie en fonction des différentes situations physiologiques.

Une fois établie ces prémisses, alors seront possibles avec grande précision l'appréciation des différentes pathologies impliquant le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique.

Il nous apparaît donc des plus évidents ou, pour le moins, loin d'être surprenant, que l'utilisation du rapport T / LH ait été jusqu'à présent si déconcertante. Chaque laboratoire utilisant le système analytique de son choix, lesquels systèmes peuvent être étalonnés contre différents étalons selon le lot particulier des troussees utilisées, il est donc loin d'être surprenant que dans l'état actuel des pratiques de laboratoires, le scientifique ne puisse utiliser avec confiance ledit rapport hormonal pour connaître les habitudes véritables d'un athlète suspect d'abus de testostérone exogène. L'utilisation d'une telle sonde demeure cependant possible mais conditionnelle à d'autres travaux de recherche qui établiront la qualité des molécules de LH dans une multitude de situations physiologiques ... avec et sans apport exogène d'hormones.

Liste des références

ALBERT A., E. Rosenberg, G. T. Ross, C. A. Paulsen et R. J. Ryan. 1968. «Report of the National Pituitary Agency Collaborative Study on the Radioimmunoassay of FSH and LH». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 28, p. 1214 - 1218.

BAGATELL C.J., K.D. Dahl et W. J. Bremner. 1994. «The Direct Effect of Testosterone to Inhibit Gonadotropin Secretion in Men Is Partially Mediated by Aromatization to Estradiol». Journal of Andrology, vol. 15, no. 1, p. 15-21

BANGHAM D. R., I. Berryman, H. Burger et al. 1973. «An International Collaborative Study of 69/104, a Reference Preparation of Human Pituitary FSH and LH». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 36, p. 647 - 660.

BEITINS Z., et V. Padmanabhan. 1991. « Bioactivity of Gonadotropines». Endocrinology and Metabolism - Clinics of North America, vol. 20, p. 85 - 120.

BHATNAGAR A. S., P. Müller, L. Schenkel, P. F. Trunet, I. Beh et K. Schieweck. 1992. «Inhibition of Estrogen Biosynthesis and Its Consequences on Gonadotrophin Secretion in the Male». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 41, no. 3-8, p. 437 - 443.

BURSTEIN S., E. Schaff-Blass, J. Blass et R. L. Rosenfield. 1985. «The Changing Ratio of Bioactive to Immunoreactive Luteinizing Hormone (LH) through Puberty Principally Reflects Changing LH Radioimmunoassay Dose-response Characteristics». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 61, p. 508 - 513.

CLOUGH K. M., F. X. Cole, S. S. Seaver, A. Vesprini, A. Y. Kuo et B. L. Lasley. 1992. «Enzyme immunoassay method for total alpha gonadotropin in human urine samples». Fertility and Sterility, vol. 57, no. 6, p. 1241 - 1246.

COWAN D. et A.Kicman. 1993. «Doping with peptide hormone». Proceedings of the Second International Symposium on Drugs in Sports. Lillhammer, Norway, August 29-31. Edited by P. Hemmersbach et K. Birkeland. P. 39-64.

CYGLER M. 1994. «Recognition of carbohydrates by antibodies». Research in Immunology, vol. 145, no. 1, p. 36 - 40.

DAHL K.D., C.A. Campen, D.M. McGuinness et W. Vale. 1992. «Differential Regulation in the Release of Bioactive Versus Immunoactive Gonadotropins from Cultured Rat Pituitary Cells by Inhibin and Androgens». Journal of Andrology, vol. 13, no. 6, p. 526 - 533.

DHARMESH S. M., et J. U. Baenziger. 1993. «Estrogen Modulates Expression of the Glycosyltransferases that Synthesize Sulfated Oligosaccharides on Lutropin». Proceedings of Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, p. 11127 - 11131.

DING X.Q., et I. Huhtaniemi. 1991. «Preponderance of Basic Isoforms of Serum Luteinizing Hormone (LH) Is Associated with the High Bio/Immuno Ratio of LH in Healthy Women and in Women with Polycystic Ovarian Disease». Human Reproduction, vol. 6, no. 3, p. 346 - 350.

DING X.Q., T. Ranta, V. Nikkanen et I. Huhtaniemi. 1991. «Discordant Levels of Serum Bioactive LH in Man as Measured in Different in-vitro Bioassay Systems Using Rat and Mouse Interstitial Cells and Human Granulosa-luteal cells». Journal of Endocrinology, vol. 128, p. 131 - 137.

DUFAU M. L., I. Z. Beitins, J. V. Mc Arthur et K. J. Catt. 1976. «Effect of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) upon bioactive and immunoreactive serum LH level in normal subjects.» Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 43, p. 658 - 667.

DUFAU M. L., C. R. Mendelson et K. J. Catt. 1974. «A Highly Sensitive in vitro Bioassay for Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin: Testosterone Production by Dispersed Leydig Cells». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 39, p. 610 - 613.

DUFAU M. L., R. Pock, A. Neubauer et K. J. Catt. 1976. «In vitro Bioassay of LH in Human Serum the Rat Interstitial Cell Testosterone (RICT) Assay». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 42, p. 958 - 969.

DUFAU M. L., et J. D. Veldhuis. 1987. «Pathophysiological Relationships Between the Biological and Immunological Activities of Luteinizing Hormone». Baillière's Clinical Endocrinology Metabolism, vol. 1, no.1, p. 153 - 176.

FINKELSTEIN J. S., L. ST. O'dea, W. Whitcomb et W. F. Crowley. 1991. «Sex Steroid Control of Gonadotropin Secretion in the Human Male. II. Effects of Estradiol Administration in Normal and Gonadotropin-Releasing Hormone-Deficient Men». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol.73, no.3, p. 621 - 628.

FUJIMOTO V. Y., S. J. Spencer, J. Rabinovici, S. Plosker et R. B. Jaffe. 1993. «Endogenous Catecholamines Augment the Inhibitory Effect of Opioids on Luteinizing Hormone Secretion During the Midluteal Phase». American Journal of Obstetric and Gynecology, vol. 169, p. 1524 - 1530.

GANDAR R., D. Collin. 1993. «Activité biologique de la lutropine (LH)». Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la reproduction, vol. 23, p. 13 - 19.

GEKKO K. et S.N. Timasheff. 1981. «Mechanism of protein stabilization by glycerol : preferential hydration in glycerol-water mixtures». Biochemistry, vol. 20. P. 4667-4676.

GENAZZANI A. R., A. D. Genazzani, C. Volpogni, F. Pianazzi, G. A. Li, N. Surico et F. Petraglia. 1993. «Opioid Control of Gonadotrophin Secretion in Humans». Human Reproduction, vol. 8, Suppl. 2, p. 151 - 153.

GOOREN L., T. Spinder, J. J. Spijkstra, H. van Kessel, A. Smals, B. R. Rao et M. Hoogslag. «Sex Steroids and Pulsatile Luteinizing Hormone Release in Men. Studies in Estrogen-Treated Agonadal Subjects and Eugonadal Subjects Treated with a Novel Nonsteroidal Antiandrogen». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 64, no. 4, p. 763 - 769.

GREEN E. D. et J. U. Baenziger. 1988. «Asparagine-linked Oligosaccharides on Lutropin, Follitropin, and Thyrotropin». The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, no. 1, p. 36 - 44.

GREEN E. D., I. Boime et J. U. Baenziger. 1986. «Differential Processing of ASN-linked Oligosaccharides on Pituitary Glycoprotein Hormones: Implications for Biologic Function.» Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 72, p. 81 - 100.

HAAVISTO A.-M., N. Simberg et I. Huhtaniemi. 1990. «The Bio/Immuno Ratio of Serum Luteinizing Hormone Increases after Orchiectomy in Prostatic Cancer Patients and Is Associated with Decreased Molecular Weight and Appearance of Isohormones with Alkaline pl Values». Biology of Reproduction, vol. 42, p. 597 - 602.

HARLIN J., S. A. Khan et E. Diczfalussy. 1986. «Molecular composition of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in commercial gonadotropin preparations». Fertility and Sterility, vol. 46, No. 6, p. 1055 - 1061.

HEMRIKA D. J., E. H. Slaats, J. C. Kennedy, T. J. M. de Vries Robles-Korsen et J. Schoemaker. 1993. «Pulsatile Luteinizing Hormone Patterns in Long Term Oral Contraceptive Users». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 77, no. 2, p. 420 - 425.

HILEMAN S. M., L. S. Lubbers, D. E. Kuehl, D.J. Schaeffer, L. Rhodes et G.L. Jackson. 1994. «Effect of Inhibiting 5 α -Reductase Activity on the Ability of Testosterone to inhibit Luteinizing Hormone Release in Male Sheep». Biology of Reproduction, vol. 50, p. 1244 - 1250.

HUHTANIEMI I.T., A.M. Haavisto, R. Anttila, M.A. Siimes et L. Dunkel. 1996. «Sensitive Immunoassay and *in vitro* Bioassay Demonstrate Constant Bioactive/ Immunoreactive Ratio of Luteinizing Hormone in Healthy Boys during the Pubertal Maturation». Pediatric Research, vol. 39, no. 1, p. 180 - 184.

HUTCHINSON J.S.M. 1988. «The interpretation of pituitary gonadotrophin assays- a continuing challenge». Journal of Endocrinology, vol. 118, p. 169 - 171.

JEFFCOATE, S. L. 1993. «Analytical and Clinical Significance of Peptide Hormone Heterogeneity with Particular Reference to Growth Hormone and Luteinizing Hormone in Serum». Clinical Endocrinology, vol. 38, p. 113 - 121.

KAISER U.B., E. Sabbagh, R.A. Katzenellenbogen, P.M. Conn et W.W. Chin. 1995. «A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 12280 - 12284.

KARDANA A., M. M. Elliott, M. A. Gawinowicz, S. Birken et L. A. Cole. 1991. «The Heterogeneity of Human Chorionic Gonadotropin (hCG): I. Characterization of Peptide Heterogeneity in 13 Individual Preparations of hCG». Endocrinology, vol. 129, p. 1541 - 1550.

KERRIGAN J. R., J. D. Veldhuis et A. D. Rogol. 1994. «Androgen-Receptor Blockade Enhances Pulsatile Luteinizing Hormone Production in Late Pubertal Males: Evidence for a Hypothalamic Site of Physiologic Androgen Feedback Action». Pediatric Research, vol. 35, p. 102 - 106.

KEUTMANN H. T., B. Dawson, W. H. Bishop et R. J. Ryan. 1978. «Structure of Human Luteinizing Hormone Alpha Subunit». Endocrine Research Communications, vol. 5(1), p. 57 - 70.

KOLB V. M. 1994. «Luteinizing Hormone regulators: Luteinizing hormone releasing hormone analogs, estrogens, opiates, and estrogen-opiate hybrids», Progress in Drug Research, vol. 42, p. 39 - 52.

LEVRAN D., I. Ben-Shlomo, A. Luski, Z. Ben-Rafael, J. Dor, S. Mashiach et D.S. Seidman. 1995. «A reappraisal of the feedback effects of oestradiol upon luteinizing hormone surge». Human Reproduction, vol. 10, no. 12, p. 3117 - 3120.

LUCY A. W., B. H. Rich, R. L. Rosenfield et V. S. Fang. 1980. «LH Bioactivity Increases More than Immunoreactivity During Puberty». Journal Pediatrics, vol. 97, p. 205 - 213.

MARTIN-DU-PAN R.C., M. Horak et P. Bischof. 1994. «Clinical significance of invisible or partially visible luteinizing hormone». Human Reproduction, vol. 9, no. 11, p. 1987 - 1990.

MITCHELL R., C. Bauerfeld, F. Schaefer, K. Schärer, W. R. Robertson. 1994. «Less acidic forms of Luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on haemodialysis treatment». Clinical Endocrinology, vol. 41, p. 65 - 73.

MITCHELL R., S. Hollis, V. Crowley, J. McLoughlin, N. Peers et W. R. Robertson. 1995. «Immunometric Assays of Luteinizing Hormone (LH): Differences in Recognition of Plasma LH by Anti-intact and β -Subunit-Specific Antibodies in Various Physiological and Pathophysiological Situations». Clinical Chemistry, vol. 41, no. 8, p. 1139 - 1145.

MITCHELL R., S. Hollis, C. Rothwell et W. R. Robertson. 1995. «Age related changes in the pituitary-testicular axis in normal men; lower serum testosterone results from decreased bioactive LH drive». Clinical Endocrinology, vol. 42, p. 501 - 507.

NISHIHARA M., A. Sano et F. Kimura. 1994. «Cessation of the Electrical Activity of Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator during the Steroid-Induced Surge of Luteinizing Hormone in the Rat». Neuroendocrinology, vol. 59, p. 513 - 519.

OKUDA K., J. Takamatsu, T. Okazaki, T. Yamada, M. Saeki et O. Sugimoto. 1994. «Hereditary Abnormality of Luteinizing Hormone Resulting in Discrepant Serum Concentrations Determined by Different Assays». Endocrine Journal, vol. 41, no. 6, p. 639 - 644.

OLUKOGA A. O., R. Mitchell, L. Walton, W. R. Robertson et I. Laing. 1996. «Differences in Serum Luteinizing Hormone Measurements by Immunoradiometric Assay Induced by Kinetic Manipulation of Assay Conditions Are Dependent on the Endocrine Milieu of Serum». Annals of Clinical Biochemistry, vol. 33, p. 107 - 111.

PADMANABHAN V. N. P. Evans, G. E. Dahl, K. L. McFadden, D. T. Mauger, F. J. Karsch. 1995. «Evidence for Short or Ultrashort Loop Negative Feedback of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion». Neuroendocrinology, vol. 62, p. 248 - 258.

PALLIKAROS Z., D. Schulster, S. A. Baldwin, R. J. A. Helliwell, A. E. Michael, B. A. Cook. 1995. «Characterization of site-directed antibodies to the LH receptor in functionally active gonadal cells and their differential effects on LH-stimulated signal transduction in Leydig tumour (MA10) cells». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 114, p. 57 - 68.

PETTERSSON K. M. I., J. R-M. Söderholm. 1991. «Individual differences in lutropine immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies». Clinical chemistry, vol. 37, p. 1745 - 1748.

PIERCE J. G. et T. F. Parsons. 1981. «Glycoprotein Hormones: Structure and function». Annual Review of Biochemistry, vol. 50, p. 465 - 495.

PIGNY P., A. Berault, D. Dewailly et A. Boersma. 1992. «Hormones glycoprotéiques, glycosylation et activité biologique». Annales de Biologie Clinique, vol. 50, p. 557 - 564.

PRENTICE L.G. et R.J. Ryan. 1975. «LH and its subunits in human pituitary, serum and urine». Journal of clinical endocrinology and metabolism, vol. 40., no 2. P. 303-312.

REIMERS T. J., J. P. McCann et R. G. Cowan. 1983. «Effects of storage times and temperatures on T₃, T₄, LH, prolactine, insuline, cortisol et progesterone concentrations in blood samples from cows». Journal of Animal Science, vol. 57, No. 3, p. 683 - 691.

RESKO J. A., P. B. Connolly, C. E. Roselli, S. E. Abdelgadir et J. V. A. Choate. 1993. «Differential Effects of Aromatase Inhibition on Luteinizing Hormone Secretion in Intact and Castrated Male Cynomolgus Macaques». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 77, no. 6, p. 1529 - 1534.

REVOL A., Y. Badonnel, S. Carreau, M. Castanier, C. Collet, L. Delvigne, I. Denis, D. Guilloteau, J.P. Moatti, M.C. Patricot et M. Roger. 1994. «Immunodosages et mesures de l'activité biologique de l'hLH sérique : résultats obtenus lors d'une étude multicentrique». Annales en Biologie Clinique, vol. 52, p. 671 - 680.

ROBERTSON D. M., et E. Diczfalusy. 1977. «Biological and Immunological Characterization of Human Luteinizing Hormone. II. A Comparison of the Immunological and Biological Activities of Pituitary Extracts after Electrofocusing Using Different Standard Preparations». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 9, p. 57 - 67.

ROBERTSON D. M., M. P. Van Damme et E. Diczfalusy. 1977. «Biological and Immunological Characterization of Human Luteinizing Hormone. I. Biological Profile in Pituitary and Plasma Samples after Electrofocusing». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 9, p. 45 - 56.

ROBERTSON D. M., B. Fröysa et E. Diczfalusy. 1978. «Biological and Immunological Characterization of Human Luteinizing Hormone. IV. Biological and Immunological Profile of two International Reference Preparations after Electrofocusing». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 11, p. 91 - 103.

ROSEMBERG, E. 1979. «Immunoreactivity of Standards and Reference Preparations Used in the Radioimmunoassay of Follicle-stimulating and Luteinizing Hormones in Serum». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 48, p. 163 - 166.

ROSENFELD R. L., et J. Helke. 1992. «Is an Immunoassay Available for the Measurement of Bioactive LH in Serum?». Journal of Andrology, vol.13, p. 1 - 10.

RUIZ E., R. Osorio, E. Osorio et E. Ortega. 1993. «Modulation of LH Secretion by Progesterone and Estradiol after Naloxone Injection in the Median Eminence». Biochemistry and Molecular Biology International, vol. 30. no. 6, p. 1093 - 1100.

SAKETOS M., N. Sharma, T. Adel, M. Raghuwanshi et N. Santoro. 1994. «Time-Resolved Immunofluorometric Assay and Specimen Storage Conditions for Measuring Urinary Gonadotropins». Clinical Chemistry, vol. 40, no. 5, p. 749 - 753.

SALESSE R., M. Castaing, J. C. Pernollet et J. Garnier. 1975. «Association-Dependent Active Folding of Alpha and Beta Subunits of Lutropin». Journal of Molecular Biology, vol. 95, p. 483 - 496.

SANTEN, J.R. 1981. « Feedback Control of Luteinizing Hormone and Follicle-stimulating Hormone Secretion by Testosterone and Estradiol in Men : Physiologic and Clinical Implications». Clinical Biochemistry, vol. 14, no. 5, p. 243 - 251.

SCHAISSON G., et B. Couzinet. 1991. «Steroid Control of Gonadotropin Secretion». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 40, no. 1-3, p. 417 - 420.

SCHWARTZ, N. B. 1995. «Follicle-stimulating Hormone and Luteinizing Hormone: a Tale of two Gonadotropins». Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 73, p. 675 - 684.

SETH J., I. Hanning, R. R. A. Bacon et W. M. Hunter. 1989. «Progress and Problems in Immunoassays for Serum Pituitary Gonadotrophins : Evidence from the UK External Quality Assessment Schemes, (EQAS) 1980-1988». Clinica Chimica Acta, vol. 186, p. 67 - 82.

SLAUGHTER S., Y. Wang, R. V. Myers et W. R. Moyle. 1995. «The Lutropin β -subunit N-terminus Facilitates Subunit Combination by Offsetting the Inhibitory Effects of Residues Needed for LH Activity». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 112, p. 21 - 25.

STANTON P. G., G. Pozvek, P. G. Burgon, D. M. Robertson et M. T. W. Hearn. 1993. «Isolation and characterization of human LH isoforms». Journal of Endocrinology, vol. 138, p. 529 - 543.

STANTON P.G., Z. Shen, E.A. Kecorius, P.G. Burgon, D.M. Robertson et M.T.W. Hearn. 1995. «Application of a sensitive HPLC-based fluorometric assay to determine the sialic acid content of human gonadotropin isoforms». Journal of Biochemical and Biophysical Methods, vol. 30, p. 37 - 48.

STORRING, P.L. 1992. «Assaying Glycoprotein Hormones - the Influence of Glycosylation on Immunoreactivity». Trends in Biotechnology, vol. 10, p. 427 - 431.

STORRING P. L., A. A. Zaidi, Y. G. Mistry, M. Lindberg, B. E. Stenning et E. Diczfalusy. 1982. «A Comparison of Preparation of Highly Purified Human Pituitary Luteinizing Hormone: Differences in the Luteinizing Hormone Potencies as Determined by in vivo Bioassays, in vitro Bioassay and Immunoassay». Acta Endocrinologica, vol. 101, p. 339 - 347.

SUGINAMI H., D. M. Robertson et E. Diczfalusy. 1978. «Influence of the Purity of the Iodinated Tracer on the Specificity of the Radioimmunoassay of Human Luteinizing hormone». Acta Endocrinologica, vol. 89, p. 506 - 511.

TOMMASELLI A. P., R. Valentino, S. Savastano, G. Randazzo, L. Scalfi, F. Contaldo, M. Dorato et G. Lombardi. 1995. «Altered glycosylation of pituitary gonadotropins in anorexia nervosa: an alternative explanation for amenorrhea ». European Journal of Endocrinology, vol. 132, p. 450 - 455.

VAN DAMME M. P., D. M. Robertson et E. Diczfalusy. 1977. «Biological and Immunological Characterization of Human Luteinizing Hormone: III. Biological and Immunological Profiles of Urine Preparations after Electrofocusing». Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 9, p. 69 - 79.

VAN GINKEL L. A. et, J. G. Loeber. 1985. «Heterogeneity of human lutropin. Detection and identification of α - and β -subunits». Acta Endocrinologica (Copenhagen), vol. 110, p. 182 - 192.

VAN GINKEL L. A. et, J. G. Loeber. 1987. «Heterogeneity of human luteinizing hormone. Detection and identification of α - and β -subunits in international reference preparations». Acta Endocrinologica (Copenhagen), vol. 114, p. 572 - 576.

VELDHUIS J. D., et M. L. Dufau. 1993. «Steroidal Regulation of Biologically Active Luteinizing Hormone Secretion in Men and Women». Human Reproduction, vol. 8, Suppl. 2, p. 84 - 96.

WAYNE L. B., J. A. Proudman, D. N. Foster et P. A. Renner. 1991. «Pattern of Secretion of Luteinizing Hormone and Testosterone in the Sexually Mature Male Turkey». General and Comparative Endocrinology, vol. 84, p. 447 - 460.

WARD D. N., S. D. Glenn, H. S. Nahm et T. Wen. 1986. «Characterization of Cleavage Products in Selected Lutropin Preparations». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 27, p. 70 - 78.

WEISS P., H. Zech, H.P. Schönholzer et H. Fritzsche. 1992. «Abbott IMX and Serono MAIAclone Assay Compared for Lutropin Determinations in Urine». Clinical Chemistry, vol. 38, no. 11, p. 2280 - 2283.

WIDE L. et T. Naessén. 1994. « 17β -Oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause». Clinical Endocrinology, vol. 40, p. 783 - 789.

WILSON C. A., A. J. Leigh et A. J. Chapman. 1990. «Gonadotrophin Glycosylation and Function». Journal of Endocrinology, vol. 125, p. 3 - 14.

WOOD R.I. et S.W. Newman. 1995. «Androgen and Estrogen Receptors Coexist within Individual Neurons in the Brain of the Syrian Hamster». Neuroendocrinology, vol. 62, p. 487-497.

XUE J. L., G. D. Dial, S. Bartsh, B. Kerkaert, E. J. Squires, W. E. Marsh, et G. Ferre. 1994. «Influence of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist on Circulating Concentrations of Luteinizing Hormone and Testosterone and Tissue Concentrations of Compounds Associated with Boar Taint». Journal of Animal Science, vol. 72, p. 1290 - 1298.

YAMADA T., J. Nakamura, Y. Okuno, S. Hosokawa, M. Matsuo, H. Yamada et M. Ohta. 1995. «A Possible Mechanism for the Increase in Serum Luteinizing Hormone Levels in Male Rats by Oxolinic Acid». Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 134, p. 35 - 42.

ZAIDI A. A., M. H. Qazi et E. Diczfalusy. 1982. «Molecular Composition of Human Luteinizing Hormone: Biological and Immunological Profiles of Highly Purified Preparations after Electrofocusing». Journal of Endocrinology, vol. 94, p. 29 - 36.