

MESURE DE L'ACTIVITÉ SOMATOTROPE HYPOPHYSAIRE PAR LE TEST TIBIA : INFLUENCE DE CERTAINS TRAITEMENTS PHYSIQUES DES HYPOPHYSES

J. Charrier, Y. Carles

▶ **To cite this version:**

J. Charrier, Y. Carles. MESURE DE L'ACTIVITÉ SOMATOTROPE HYPOPHYSAIRE PAR LE TEST TIBIA : INFLUENCE DE CERTAINS TRAITEMENTS PHYSIQUES DES HYPOPHYSES. Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, 1974, 14 (2), pp.377-381. hal-00896888

HAL Id: hal-00896888
https://hal.science/hal-00896888

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 1974, **14** (2), 377-381.

NOTE

MESURE DE L'ACTIVITÉ SOMATOTROPE HYPOPHYSAIRE PAR LE TEST TIBIA : INFLUENCE DE CERTAINS TRAITEMENTS PHYSIQUES DES HYPOPHYSES

J. CHARRIER
avec la collaboration technique de Y. CARLES

Station de Physiologie animale, I. N. R. A.,
École nationale supérieure agronomique, Place Viala,
34060 Montpellier Cedex

RÉSUMÉ

L'estimation du contenu en hormone somatotrope d'une hypophyse nécessite au préalable son homogénéisation. Trois types de traitements ont été envisagés : ultraturrax, ultrasons, potter. Les deux premiers détruisent l'activité biologique. Seul le broyage au potter la conserve.

INTRODUCTION

Le test d'accroissement en épaisseur du cartilage de tibia de rat hypophysectomisé (EVANS *et al.*, 1943 ; GREENSPAN *et al.*, 1949 ; GESHWIND et LI, 1955) est classiquement utilisé pour mesurer l'activité somatotrope de l'hypophyse. Cette glande doit auparavant être mise sous forme injectable, donc homogénéisée. Des déboires initiaux nous ont amenés à voir dans quelle mesure ce traitement pouvait affecter les résultats obtenus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons testé trois types de mise en suspension dans l'eau distillée du tissu hypophysaire :

a) par projection à grande vitesse (20 000 t/mn) du matériel tissulaire contre un stator d'acier crénelé, type Ultraturrax ;

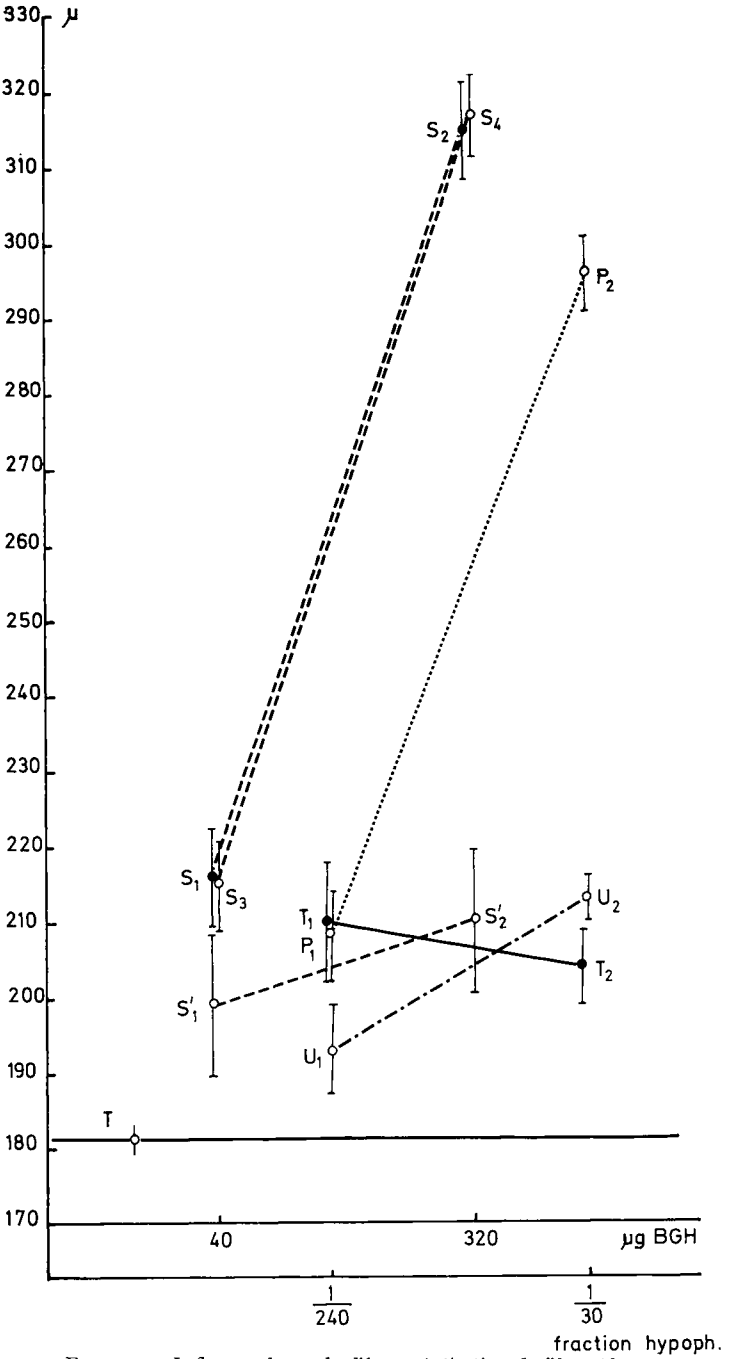


FIG. 1. — *Influence du mode d'homogénéisation de l'hypophyse sur la réponse du cartilage tibial*

S_1-S_2 : droite standard BGH purifiée en solution aqueuse.
S_3-S_4 : mêmes doses que S_1 et S_2, après passage au Potter.
S'_1-S'_2 : mêmes doses que S_1 et S_2, après passage à l'Ultraturrax.
P_1-P_2 : droite réponse obtenue avec un homogénat au Potter d'hypophyse ovine (n° 90 148) aux doses totales de 1/240 et 1/30 d'hypophyse par rat.
T_1-T_2 : même matériel et mêmes doses, traitement Ultraturrax.
U_1-U_2 : même matériel et mêmes doses, traitement ultrasons.

b) par ultrasons de fréquence 20 000 hertz ;

c) par écrasement à la main dans un broyeur de Potter-Elvehjem.

Dans les minutes qui suivent son prélèvement, chaque hypophyse est pesée, mise en suspension par homogénéisation au Potter, congelée et conservée à — 25°C en attendant d'être dosée.

Pour obtenir une bonne homogénéisation le broyage durait dans chaque cas de 2 à 3 minutes, en chambre froide à + 4°C. Cette durée totale représente la somme d'une succession de petites séquences d'une dizaine de secondes pour éviter une élévation de température de la solution. Ont été ainsi traités une GH bovine purifiée (BGH Byla lot 01/69) et des tissus hypophysaires totaux.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites précédemment (voir « Dosage de l'hormone de croissance (GH) par le test tibia : importance du choix des animaux »).

RÉSULTATS

Les données de la figure 1 nous permettent de constater que l'activité biologique de la solution standard contenant la GH purifiée (droite S_1-S_2) n'est en rien affectée par son traitement au Potter (S_3-S_4). Par contre, après traitement à l'Ultraturrax, cette même solution standard perd toute activité biologique (S'_1-S'_2)

Avec du matériel hypophysaire brut, le même phénomène se produit. Une hypophyse homogénéisée au Potter donne une droite réponse P_1-P_2 parallèle au standard S_1-S_2. Lorsque la glande est traitée à l'Ultraturrax (T_1-T_2) ou aux ultrasons (U_1-U_2), on assiste à un effondrement de l'activité biologique.

Par ailleurs, un changement d'aspect très net se produit au sein de la solution standard après passage à l'Ultraturrax : de parfaitement limpide, elle devient trouble. Elle peut être recla-

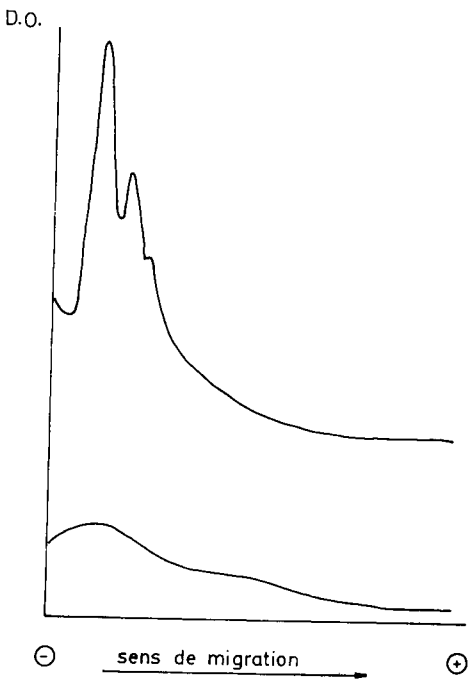


FIG. 2. — *Chromatoélectrophorèse sur gel polyacrylamide d'une solution aqueuse de BGH* (200 µg)
avant (en haut) *et après* (en bas) *passage à l'Ultraturrax*

rifiée par centrifugation avec obtention d'un culot, mais la dialyse de ce culot contre un tampon à pH élevé pendant 72 heures n'a pas permis sa remise en solution.

En électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 p. 100 la BGH Byla 69/01 donne trois bandes caractéristiques. Après traitement de la solution à l'Ultraturrax ou aux ultrasons, ces trois bandes disparaissent complètement (fig. 2).

DISCUSSION

Toutes les observations faites : perte d'activité biologique, augmentation de la turbidité de la solution et obtention d'un culot de centrifugation, disparition des pics d'électrophorèse, laissent penser que des traitements mécaniques violents comme l'homogénéisation à l'Ultraturrax ou aux ultrasons provoquent une dénaturation de la protéine hormonale. Le fait que le culot de centrifugation ne puisse être remis en solution après une dialyse prolongée contre un tampon de pH élevé permet de supposer que cette dénaturation est irréversible.

La protéine, soluble à l'origine, se présente après dénaturation sous forme d'agrégats, qui précipitent. Ces agrégats auraient un encombrement spatial beaucoup trop important pour pouvoir pénétrer dans le gel de polyacrylamide, ce qui expliquerait la disparition des deux bandes de migration.

Au niveau moléculaire, on peut supposer que les liaisons hydrogènes, responsables de la structure tertiaire de la protéine, ont été rompues par l'énergie mécanique, entraînant une destructuration de la molécule, et se sont spontanément réétablies entre chaînes de façon anarchique, provoquant l'apparition des agrégats (MARTY et MORETTI).

Un récent rapport de FROHMAN *et al.* (1972) fait mention d'une chute marquée d'immunoréactivité de préparations purifiées de GH de différentes origines après ultrasonication. Il est donc possible que l'activité immunologique comme l'activité biologique soit affectée par ce type de traitement.

Reçu pour publication en octobre 1973.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en partie grâce au contrat D. G. R. S. T. n° 71-7-3129 « Biologie de la Reproduction et du Développement. Développement postnatal ».

SUMMARY

DETERMINATION OF PITUITARY SOMATOTROPIC ACTIVITY BY TIBIA TEST : EFFECT OF THE HOMOGENEIZING PROCESS OF THE GLAND

To estimate the pituitary growth hormone content, the gland must be previously homogeneized. Three different treaments have been considered : ultraturrax, ultrasound, potter. Both the first impair any biological activity ; only the latter preserves it.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHARRIER J., 1973. Dosage de l'hormone de croissance (GH) par le test tibia : Importance du choix des animaux. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* (à paraître).

EVANS H. M., SIMPSON M. E., MARX W., KIBRICK E. A., 1943. Bioassay of pituitary growth hor-

mone. Width of the proximal epiphyseal cartilage of the tibia in hypophysectomized rats. *Endocrinology.*, **32**, 13-16.

FROHMAN L. A., BUREK L., STACHURA M. E., 1972. Characterization of growth hormone of different molecular weights in rat, dog an human pituitaries. *Endocrinology.*, **91**, 262-269.

GESHWIND I. I., LI C. H., 1955. in : SMITH R. W., GAEBLER O. H., and LONG C. N. H. *The hypophyseal growth hormone, nature and actions*, 28-58. Mc Graw Hill. New York.

GREENSPAN F. S., LI C. H., SIMPSON M. E., EVANS H. M., 1949. Bioassay of hypophyseal growth hormone : the tibia test. *Endocrinology.*, **45**, 455-463.

MARTY J., MORETTI J. (Communication personnelle).