



**HAL**  
open science

## ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE D'HORMONES POSTHYPOPHYSAIRES APRÈS INJECTION DE 35S-CYSTÉINE CHEZ LA BREBIS

J. Martinet, Jacqueline Flament-Durand, Micheline Massoud, Jacqueline Paly

### ► To cite this version:

J. Martinet, Jacqueline Flament-Durand, Micheline Massoud, Jacqueline Paly. ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE D'HORMONES POSTHYPOPHYSAIRES APRÈS INJECTION DE 35S-CYSTÉINE CHEZ LA BREBIS. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 1974, 14 (1), pp.1-13. <hal-00896861>

**HAL Id: hal-00896861**

**<https://hal.science/hal-00896861v1>**

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.



HAL Authorization

## ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE D'HORMONES POSTHYPOPHYSAIRES APRÈS INJECTION DE <sup>35</sup>S-CYSTÉINE CHEZ LA BREBIS

J. MARTINET et Jacqueline FLAMENT-DURAND\*  
avec la collaboration technique de Micheline MASSOUD et Jacqueline PALY

*Laboratoire de Physiologie de la Lactation,  
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,  
78350 Jouy en Josas*

\* *Laboratoire d'Anatomie pathologique,  
Université Libre de Bruxelles*

---

### RÉSUMÉ

Le processus de neurosécrétion au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus a été précédemment étudié chez le Rat par des techniques d'autohistoradiographie, après injection intraventriculaire de <sup>35</sup>S-cystéine.

Pratiquée dans des conditions sensiblement identiques chez la Brebis, cette expérience fournit des résultats comparables : 2 heures après l'injection, marquage sélectif des noyaux paraventriculaires et supraoptiques — pas de radioactivité dans la posthypophyse ; 24 heures après l'injection, marquage hypothalamique et posthypophysaire intense.

Toutefois cette technique ne peut en aucun cas amener à conclure sur la dynamique de la biosynthèse des hormones posthypophysaires. C'est pourquoi les auteurs ont effectué une extraction de la partie hormonale radioactive synthétisée par les noyaux supraoptiques et paraventriculaires et ayant transité vers la neurohypophyse, chez la brebis normale abattue 24 heures après l'injection intraventriculaire de 2 mCi de <sup>35</sup>S-cystéine. L'extraction est effectuée par affinité des hormones pour la neurophysine.

Il apparaît que l'importance de cette neurosécrétion est de l'ordre de 6 à 75 mU (ocytocine + vasopressine) par heure chez la brebis normale. La cystéine marquée se révèle comme un matériel de choix pour l'étude de la synthèse hypothalamique d'hormone posthypophysaire.

---

### INTRODUCTION

L'un de nous a étudié précédemment la neurosécrétion chez le Rat au moyen de deux techniques : la coloration à l'hématoxyline chromique de Gomori et l'autohistoradiographie après injection de <sup>35</sup>S-cystéine (FLAMENT-DURAND, 1966). Au niveau des neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de

l'hypothalamus du rat normal, noyaux où se produisent au moins les premiers stades de la synthèse des hormones posthypophysaires, les deux méthodes ont fourni des résultats identiques (fixation sélective de  $^{35}\text{S}$ -cystéine dès la première demi-heure après l'injection et coloration intense à l'hématoxyline chromique).

Par contre, chez des rats soumis à un régime déshydraté, la technique autohistoradiographique a permis d'observer, dans un délai de dix heures suivant l'injection de la cystéine marquée, un important transit de matériel radioactif entre les lieux de biosynthèse et la posthypophyse, alors que la coloration du lobe postérieur a révélé une déplétion en matériel Gomori positif.

L'interprétation de ces observations nous conduit à penser que l'abondance de matériel radioactif révèle une forte activité de synthèse et un transit massif, alors que l'absence de substance Gomori positive serait l'indice d'une libération rapide ou d'une transformation du neurosécrétat présent dans la neurohypophyse.

La complexité des phénomènes de biosynthèse, de transport, de stockage, puis de libération des hormones posthypophysaires, ainsi que la signification des différentes méthodes d'analyse utilisées ont été soulignées dès 1957 par ACHER et FROMAGEOT. En effet, peu après la parturition de la Ratte, STUTINSKY (1953) observe une disparition presque totale, dans la posthypophyse, de la substance chromophile Gomori positive, alors que le contenu de cette dernière en vasopressine et ocytocine ne diminue que d'environ 10 p. 100 (DICKER et TYLER, 1953).

Par ailleurs, VILHART (1970) a décrit dans la *pars nervosa* des rats déshydratés, un bon parallélisme entre la quantité de matériel neurosécrétoire et le contenu en vasopressine.

Cette hétérogénéité dans les résultats tient en partie à ce qu'il est difficile de définir avec précision la nature du matériel coloré par la technique de Gomori. De même, il est vraisemblable que la radioactivité décelée par l'observation autohistoradiographique, après l'injection d'un acide aminé marqué provient de diverses molécules protéiques dont certaines ne sont pas en rapport avec la synthèse du neurosécrétat (MARTINET et FLAMENT-DURAND, 1969).

C'est pour préciser la nature des substances marquées rapidement dans le complexe hypothalamo-neurohypophysaire après l'injection d'un acide aminé radioactif, que nous avons effectué cette étude chez la Brebis, espèce qui permet la préparation de matériel biologique en quantités importantes.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

### A. — Préparation des animaux et voie chirurgicale

Les brebis de race *Préalpes du Sud* en fin de lactation (poids moyen 45 kg) sont anesthésiées par l'injection intraveineuse de 20 ml du mélange suivant :

Thiopental sodique . . . . .	1 g
Pentobarbital sodique (sol à 6 p. 100) . . . . .	5 ml
Atropine (sulfate) . . . . .	40 mg
Sérum physiologique QS . . . . .	50 ml

Après intubation trachéale, l'anesthésie est entretenue à l'aide d'un mélange gazeux composé d'oxygène, de protoxyde d'azote et de fluothane (Avlon).

La voûte crânienne est dénudée en région médiane, puis une trépanation est pratiquée vers le milieu de la distance séparant la partie postérieure du crâne et une ligne joignant les angles

supérieurs des orbites, latéralement à 1 cm de la suture médiane. Une aiguille (10 cm ; 8/10<sup>e</sup>) est guidée manuellement jusqu'au ventricule latéral, l'apparition de liquide céphalorachidien permet de situer le lieu d'injection. Deux millicuries de <sup>35</sup>S, DL-cystéine (activité spécifique 4,5 mCi/mM) en solution dans 0,2 ml de sérum physiologique, sont injectées lentement. Après le retrait de l'aiguille, la peau est suturée.

Les animaux sont abattus soit 2 heures, soit 24 heures après l'injection.

### B. — Autohistoradiographie

Les cerveaux et les hypophyses après fixation dans le formol à 10 p. 100 sont enrobés dans la paraffine et coupés à 7  $\mu$ .

Les coupes déparaffinées sont couvertes par une émulsion Ilford de type K<sub>8</sub> et exposées pendant une période de 10 à 15 jours.

### C. — Identification des hormones posthypophysaires radioactives

#### 1. Par gel filtration sur Séphadex G 25, puis chromatographie sur papier.

Le lobe postérieur de l'hypophyse de 2 brebis est prélevé 24 heures après l'injection de <sup>35</sup>S cystéine, puis broyé et homogénéisé dans 1 à 2 ml d'acide acétique 0,1 N à 0°C. Le broyat est ensuite centrifugé et le surnageant posé sur une colonne (0,9 × 35 cm) de Séphadex G 25 (fine grade). La colonne est éluée à l'acide acétique 0,1 N.

Le point d'éluion de la fraction lente correspondant aux hormones neurohypophysaires est préalablement repéré par essai biologique sur glande mammaire, *in vitro*. Cette fraction est concentrée par évaporation sous vide, et soumise à une chromatographie descendante sur papier Wathman 1 dans le solvant N butanol-acide acétique-eau (4-1-5). Des marqueurs ocytocine (hormone de synthèse purifiée, 400 UI/ml, Sandoz) et vasopressine (hormone de synthèse, 250 UI/ml, Sandoz) sont utilisés simultanément au cours des chromatographies et révélés selon la technique de chlorination (REINDEL et HOPPE, 1954).

La radioactivité du chromatogramme est lue au Scanner Packard (modèle 7201).

#### 2. Par affinité pour la neurophysine.

##### a) Préparation de la neurophysine.

Le complexe neurophysine-peptides hormonaux est préparé à partir de posthypophyses de Bœuf (ACHER, LIGHT et du VIGNEAUD, 1958) puis mis en solution dans l'acétate d'ammonium 0,02 N, pH 5,5, et dissocié sur une colonne de DEAE-cellulose (forme OH), (2 × 15 cm). La vasopressine et l'ocytocine dissoutes dans l'acétate d'ammonium 0,02 N, pH 5,5, ne sont pas retenues sur la colonne. La fraction protéique contenant la neurophysine est éluee à pH 5,5 par l'acétate d'ammonium 0,3 N, dialysée pendant 24 heures (PORTANOVA et SACHS, 1967), puis lyophilisée. Une séparation des différentes neurophysines paraissant inutile pour atteindre le but que nous nous proposons, nous nous sommes arrêtés à ce stade de neurophysine globale. Une moitié de la neurophysine ainsi purifiée est remise en solution dans l'acide acétique 0,1 N, pH 3,1, l'autre moitié dans un tampon acétate de sodium 0,1 N, pH 5,8.

##### b) Préparation d'une fraction peptidique posthypophysaire.

Les animaux sont préparés selon la technique précédemment décrite et abattus 24 heures après l'injection de <sup>35</sup>S-cystéine. Les lobes postérieurs sont broyés et homogénéisés dans 1 à 2 ml d'acide acétique 0,1 N à 0°C par hypophyse. Les broyats sont centrifugés (2 000 g, 20 minutes). Le sédiment est réextrait par 0,5 ml d'acide acétique 0,1 N, puis recentrifugé.

Ce culot représentant une fraction protéique insoluble dans l'acide acétique est hydrolysé avec 1 ml de soude 1 N et sa radioactivité est évaluée au Tricarb Packard modèle 3375 en scintillation liquide. Le mélange scintillant utilisé est le suivant : 100 mg POPOP 1.4 bis [2-(4-méthyl-5-phénylaxzoly)] benzène, 4 g PPO (2 · 5-diphényloxazole), 500 ml Triton X 100, par litre de toluène. Les flacons Packard sont remplis à raison de 5 ml de solution aqueuse pour 15 ml de mélange scintillant.

Les surnageants sont mélangés, puis traités à l'acide trichloracétique TCA (concentration finale 5 p. 100) qui précipite une deuxième fraction protéique dont la radioactivité est mesurée et ajoutée à celle de la fraction protéique insoluble dans l'acide acétique 0,1 N.

Le surnageant acido-soluble final contient essentiellement les peptides et les acides aminés libres. L'acide trichloracétique est ensuite éliminé de ce surnageant, soit par fixation sur amberlite IR 45 (par agitation), soit par extraction à l'éther (V/V et agitation). La radioactivité est mesurée par la même méthode que pour les protéines.

c) *Mise en évidence, par la mesure de l'affinité entre la neurophysine et les peptides, de la présence d'hormone posthypophysaire dans la fraction TCA soluble.*

La nature des substances radioactives contenues dans la fraction TCA soluble est étudiée selon la technique suivante.

Selon le pH de la solution, la neurophysine fixe sélectivement un pourcentage variable d'hormone posthypophysaire :

— à pH 3,1, 90 à 95 p. 100 de l'ocytocine et de la vasopressine sont libres ;

— à pH 5,8, 82 à 85 p. 100 de ces deux hormones sont liés à la neurophysine (GINSBURG et IRELAND, 1964).

La fraction TCA soluble préparée selon la technique décrite dans le paragraphe B-b précédent est partagée en 3 parties :

α) Un tiers du surnageant est appliqué sur une colonne de Séphadex G 25 (fine grade, 21 × 1 cm) puis élué par fraction de 1,8 ml avec de l'acétate de sodium 0,1 N, pH 5,8.

β) Un tiers du surnageant est incubé une nuit à 4°C en présence de neurophysine en excès, c'est-à-dire en quantité suffisante pour fixer 100 à 400 unités d'hormone (GINSBURG et IRELAND, 1965 ; BRESLOW et ABRASH, 1966). La neurophysine est mise en solution dans un tampon acétate de sodium 0,1 N, pH 5,8. Le mélange est ensuite passé sur une colonne de Séphadex G 25 (fine grade, 21 cm × 1) et élué avec le même tampon à pH 5,8.

γ) La troisième partie du surnageant est incubée une nuit à 4°C avec de la neurophysine en excès en solution dans l'acide acétique 0,1 N, pH 3,1, le mélange est ensuite posé sur une colonne de Séphadex G 25 (fine grade, 21 × 1 cm) et élué avec la même solution.

Dans les 3 cas, la radioactivité des fractions éluées de la colonne de Séphadex est mesurée en scintillation liquide au compteur Tricarb Packard. La quantité de protéines est appréciée par la technique de LOWRY *et al.* (1951). Le volume d'éluion de l'ocytocine et de la vasopressine filtrées sur les colonnes de Séphadex a été déterminé par dosage biologique de ces 2 hormones sur des aliquotes des fractions éluées.

#### D. — *Identification des hormones par leur activité biologique*

Nous avons utilisé, pour déceler la présence d'ocytocine la contraction *in vitro* d'un lambeau de glande mammaire de Cobaye prélevé au quatrième jour de la lactation et baignant dans le milieu suivant : NaCl 8, KCl 0,84, MgCl<sup>2</sup> 0,10, CaCl<sup>2</sup> 0,24, CO<sup>3</sup>NaH 0,5, glucose 0,5 en grammes par litre, eau distillée QS pour 1 litre.

L'enregistrement des contractions de la glande mammaire de Cobaye se fait au moyen d'un capteur de force Sanborn FTA 1 suivi d'un ensemble enregistreur. Pour la vasopressine, la détection est effectuée selon DEKANSKI (1952) par l'observation des variations de la pression artérielle du Rat.

## RÉSULTATS

### A. — *Autohistoradiographie*

L'observation autohistoradiographique des hypothalamus et des posthypophysés de Brebis confirme les résultats obtenus chez le Rat (FLAMENT-DURAND, 1966). Deux heures après l'injection de 2 mCi de <sup>35</sup>S-cystéine dans le ventricule latéral, on observe un marquage intense et très sélectif au niveau des noyaux paraventriculaires et supraoptiques (photo 1). A ce moment aucune radioactivité n'est décelable au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse. Vingt-quatre heures après l'injection de <sup>35</sup>S-cystéine, un marquage persiste au niveau des neurones magnocellulaire de

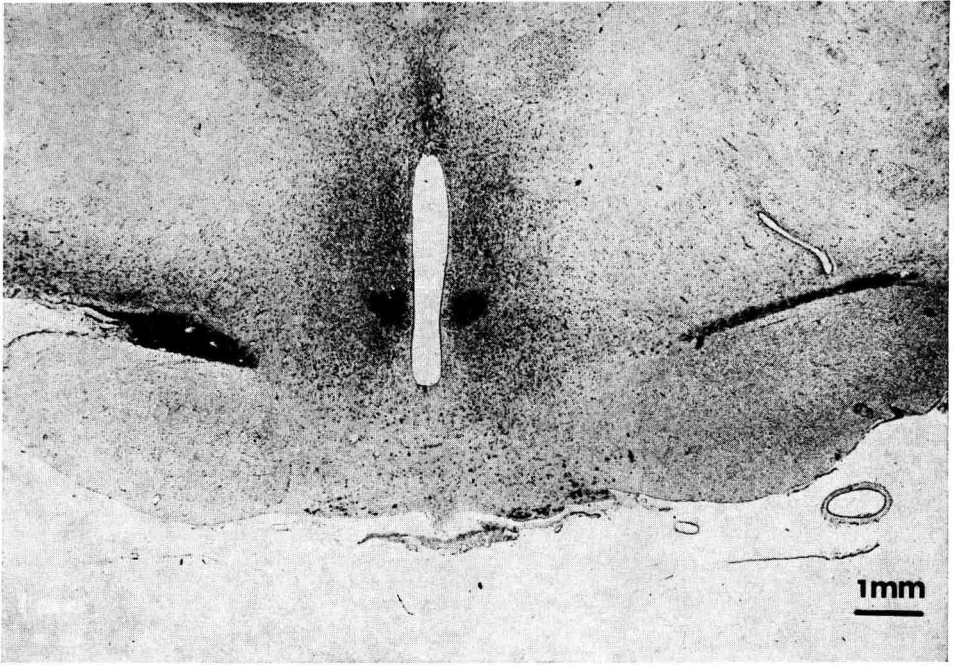


PHOTO 1. — *Autohistographie. Brebis abattue 2 heures après l'injection intraventriculaire de  $^{35}\text{S}$ -cystéine*

Coupe verticale et transverse du cerveau au niveau des noyaux paraventriculaires (au centre) et supraoptiques (à gauche et à droite au-dessus des nerfs optiques)

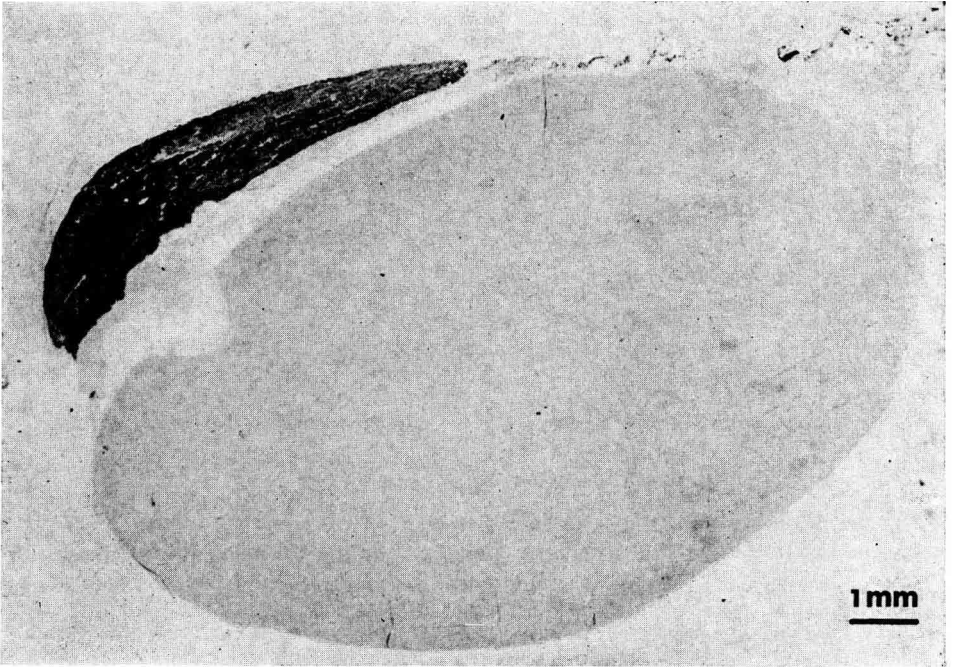


PHOTO 2. — *Autohistographie. Brebis abattue 24 heures après l'injection intraventriculaire de  $^{35}\text{S}$ -cystéine*

Coupe longitudinale de l'hypophyse. Importante radioactivité sélectivement localisée dans le lobe postérieur

l'hypothalamus, mais une intense radioactivité est apparue dans le lobe postérieur de l'hypophyse (photo 2). On ne peut observer de marquage le long du tractus hypothalamo-hypophysaire.

B. — *Identification des hormones posthypophysaires radioactives*

a) *Chromatographie sur papier après filtration sur gel Séphadex G 25.*

Cette technique ne nous a pas donné de résultats satisfaisants dans l'isolement et l'identification du matériel radioactif TCA soluble contenu dans les posthypophysés. Celui-ci contient de nombreux peptides et acides aminés libres qui

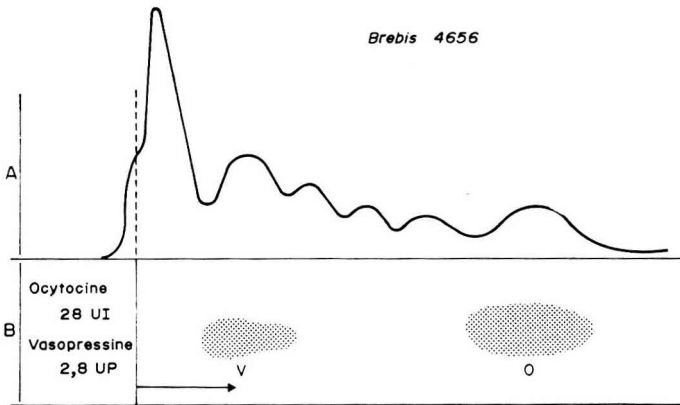


FIG. 1. — *Chromatographie sur papier d'un extrait posthypophysaire*

A : lecture de la radioactivité du chromatogramme au Scanner Pacakrd (modèle 7201) ;

B : révélation des marqueurs chromatographiés ;

O : oxytocine ;

V : vasopressine.

interfèrent lors de la chromatographie avec les hormones posthypophysaires, rendant ainsi difficile l'identification de ces dernières. Toutefois, la présence de 2 pics de radioactivité correspondant aux RF de migration des marqueurs oxytocine et vasopressine, semble indiquer la néoformation de ces 2 hormones (fig. 1).

b) *Affinité pour la neurophysine.*

Les observations sont relatives à 2 séries expérimentales.

*Première série expérimentale (animaux 113-114-115).*

α) La filtration sur colonne de Séphadex G-25 de l'extrait TCA soluble des posthypophysés permet d'observer un très léger pic de radioactivité au niveau du volume d'éluion des protéines de poids moléculaire supérieur à 5 000 suivi d'un pic important correspondant au volume d'éluion des hormones posthypophysaires (fractions 8 à 18 ; fig. 2 A et 3 A).

β) La même quantité d'extrait posthypophysaire incubé préalablement avec la neurophysine à pH 5,8 montre un profil d'éluion de la radioactivité sensiblement

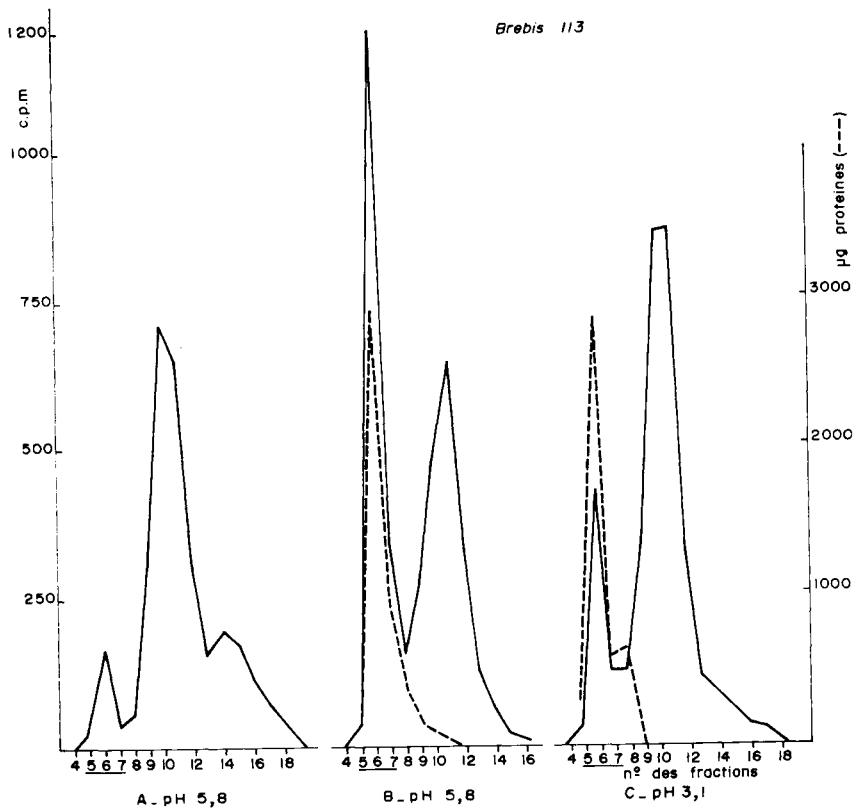


FIG. 2. — Brebis 113. Mise en évidence des peptides hormonaux neurohypophysaires marqués.  
Affinité pour les neurophysines

Élution sur Séphadex G 25 (radioactivité de l'éluat et concentration protéique)

- A : extrait acido-soluble de posthypophyse seul ;  
 B : extrait acido-soluble de posthypophyse ;  
     + neurophysine, pH 5,8 ;  
 C : extrait acido-soluble de posthypophyse ;  
     + neurophysine, pH 3,1.

TABLEAU I

Répartition de la radioactivité entre les différentes fractions des extraits posthypophysaires

Brebis N°	Radioactivité totale de la posthypophyse en d.p.m.	Fraction protéique		Fraction acido-soluble			
		en d.p.m.	en p. 100*	Peptides non hormonaux et acides aminés		Peptides hormonaux	
				en d.p.m.	en p. 100*	en d.p.m.	en p. 100*
8671	87 775	66 400	75,6	18 105	20,6	3 270	3,7
8170	72 904	53 600	73,6	15 652	21,5	3 652	5,0
114 + 115	426 054	155 430	36,5	245 600	57,6	25 024	5,9
113	51 483	28 290	55	16 972	33	6 220	12,0

\* En p. 100 de la radioactivité totale de la posthypophyse.

différent du précédent (fig. 2 B et 3 B). La fraction neurophysine (tubes 5, 6 et 7) est très radioactive ; elle est suivie d'un pic de radioactivité peptidique.

$\gamma$ ) Le dernier tiers de l'extrait posthypophysaire incubé avec la neurophysine à pH 3,1 révèle un profil d'éluion de la radioactivité identique à celui de l'extrait posthypophysaire seul décrit en  $\alpha$  (fig. 2 C et 3 C).

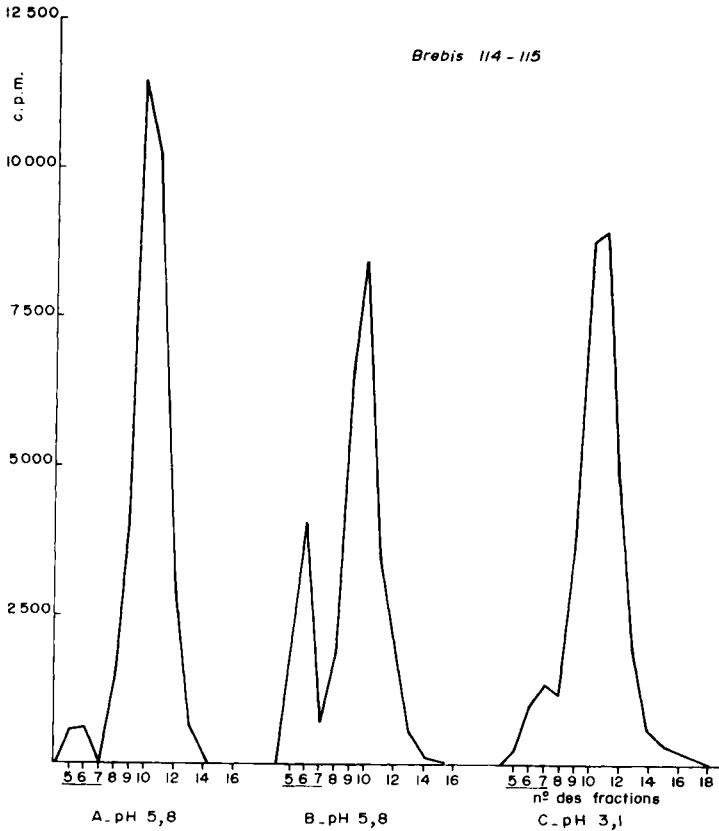


FIG. 3. — Brebis 114-115. Mise en évidence des peptides hormonaux neurohypophysaires marqués. Affinité pour les neurophysines

Éluion sur Séphadex G 25 (radioactivité de l'éluat)

A : extrait acido-soluble de posthypophyse seul ;

B : extrait acido-soluble de posthypophyse ;

+ neurophysine, pH 5,8 ;

C : extrait acido-soluble de posthypophyse ;

+ neurophysine, pH 3,1.

#### Deuxième série expérimentale (animaux 8170 et 8671).

Les profils d'éluion de la colonne de Séphadex G-25 ne portent que sur des incubats de l'extrait TCA soluble avec la neurophysine en excès, soit à pH 3,1, soit à pH 5,8 (fig. 4 et 5).

Nous avons évalué par différence entre les surfaces des profils d'éluion de la radioactivité à pH 5,8 et à pH 3,1 la répartition de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine posthypophysaire

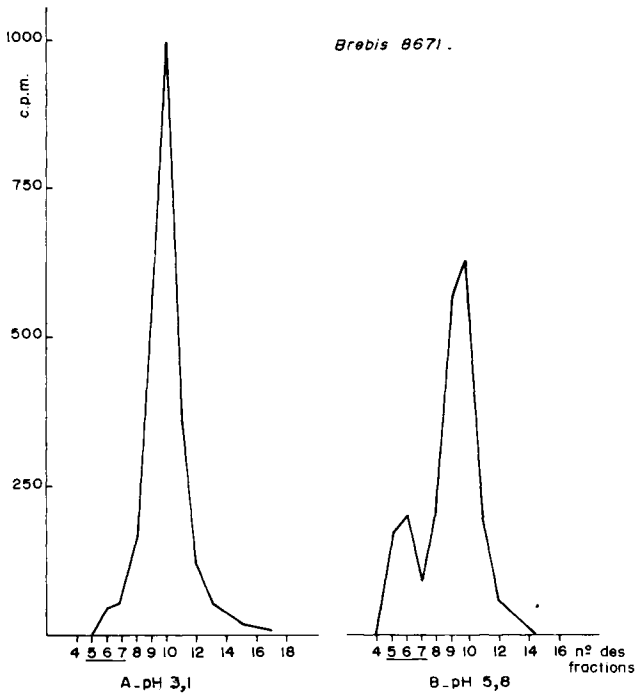
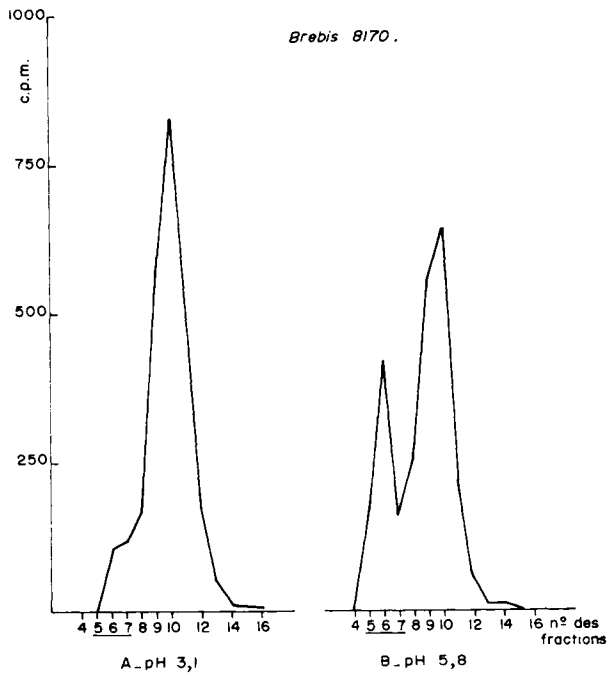


FIG. 4 et 5. — *Brebis 8170-8671. Mise en évidence des peptides neurohormonaux marqués. Affinité pour les neurophysines*

Évolution sur Séphadex G 25 (radioactivité de l'éluat)

A : extrait acido-soluble de posthypophyse;  
+ neurophysine, pH 3,1 ;

B : extrait acido-soluble de posthypophyse;  
+ neurophysine, pH 5,8.

entre les différentes fractions protéiques pour des animaux abattus 24 heures après l'injection intraventriculaire. Le tableau 1 montre qu'en 24 heures la radioactivité de la cystéine marquée dans la posthypophyse se répartit ainsi : 36 à 76 p. 100 dans la fraction protéique, 20 à 57 p. 100 dans la fraction peptides non hormonaux et acides aminés, 3 à 12 p. 100 dans la fraction hormones posthypophysaires.

## DISCUSSION

L'observation des autohistoradiographies obtenues chez la Brebis confirme les résultats trouvés précédemment par la même technique chez le Rat (SLOPER, 1958 ; FLAMENT-DURAND, 1961). L'apparition rapide de radioactivité dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus traduit l'incorporation précoce de l'acide aminé dans les protéines, les polypeptides et peptides présents dans des structures nerveuses spécifiques et anatomiquement bien délimitées. Les premiers stades de l'incorporation de la cystéine injectée correspondraient vraisemblablement à son entrée dans la fraction microsomale magnocellulaire (CLOUET et RICHTER, 1959). Au cours de cette étape on ne peut trouver, selon SACHS et TAKABATAKE (1964), d'hormone néoformée.

Ainsi, pour les animaux abattus 2 heures après l'injection intraventriculaire de  $^{35}\text{S}$ -cystéine, seuls les noyaux hypothalamiques spécifiques apparaissent marqués, les autres structures ne se différenciant pas de la teinte du fond. Il faut attendre 24 heures pour observer la présence de radioactivité dans la posthypophyse. Par analogie avec les résultats des expériences effectuées chez la Ratte, nous pouvons attribuer ce marquage à la migration vers la posthypophyse de substances néoformées dans l'hypothalamus. Il est intéressant de remarquer en outre que les délais d'apparition de la radioactivité dans la posthypophyse sont sensiblement du même ordre de grandeur que chez le Rat (8-17 h, FLAMENT-DURAND, 1966), chez le Moineau (*Zonotrichia Leucophrys Gambelli*) (6-24 h, TAGUCHI *et al.*, 1966).

Il faut cependant souligner que dans certaines espèces ou dans certaines conditions expérimentales, des différences notables peuvent apparaître indiquant que la vitesse du flux neurosécrétoire ou que la longueur du tractus hypothalamo-hypophysaire sont variables.

Ainsi, chez un poisson, le *Migurnus Anguillicandatus*, le processus semble particulièrement accéléré, puisque la posthypophyse serait marquée 3 heures après l'injection intramusculaire de leucine tritiée (INOUE et SATO, 1966).

Chez la Souris, ROUX (1968) signale une incorporation posthypophysaire très précoce, 15 minutes après l'injection de  $^{35}\text{S}$ -méthionine ou d'arginine tritiée, bien que la voie intrapéritonéale utilisée par cet auteur ne permette un marquage direct, la pénétration étant plus lente dans l'espace intracrânien, par voie générale que par la voie sous-arachnoïdienne (GAITONDE et RICHTER, 1955-1956 ; SLOPER, ARNOTT et KING, 1960).

Si l'on se réfère aux vitesses du flux neurosécrétoire entre les noyaux hypothalamiques et la posthypophyse du Rat (24 à 48 mm/jour pour PICKERING et JONES, 1970-1971 ; 48 à 72 mm/jour pour NÖRSTROM et SjöSTRAND, 1971), il

est probable que chez la Brebis l'arrivée dans la posthypophyse des premières substances neurosécrétoires marquées devrait se situer 15 à 18 heures après l'injection intraventriculaire. Ainsi 24 heures après l'injection de  $^{35}\text{S}$ -cystéine, nous devons nous trouver sensiblement en phase croissante ou au maximum de la radioactivité incorporée. Une étude plus systématique de la vitesse de migration doit être entreprise pour préciser ce point.

La recherche et l'identification des substances radioactives par des techniques biochimiques permet d'établir que 3 à 12 p. 100 de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine injectée se retrouvent 24 heures après dans la posthypophyse sous forme d'hormones néoformées. Ces résultats peuvent cependant sous-estimer la quantité d'hormones synthétisée. En effet, la technique que nous avons utilisée pour l'extraction des peptides hormonaux est basée sur l'affinité de ceux-ci envers la neurophysine, affinité qui, selon GINSBURG et IRELAND (1964) devrait aboutir à la fixation de 80 à 90 p. 100 des hormones contenues dans l'extrait. Toutefois nous avons, depuis, déterminé le degré de fixation de l'ocytocine tritiée (MORGAT *et al.*, 1970) pour la neurophysine bovine totale couplée à du Sépharose 4 B. Dans les conditions de pH déterminées par GINSBURG et IRELAND (1964) nous ne retrouvons que 45 à 50 p. 100 de l'ocytocine retenue sur le complexe neurophysine-Sépharose. Il serait important de déterminer si, en présence d'un excès de neurophysine, le pourcentage d'hormone fixée diffère selon que les neurophysines sont libres ou liées au Sépharose.

Quoi qu'il en soit, la vitesse d'incorporation de la cystéine lors de la synthèse des hormones posthypophysaires chez la brebis normale semble assez rapide. En effet, si nous faisons une rapide comparaison des résultats obtenus par PICKERING et JONES (1971) après injection de  $\text{H}^3$ -tyrosine avec les résultats du présent travail utilisant la  $^{35}\text{S}$ -cystéine, nous pouvons calculer que 2 heures après l'injection de tyrosine tritiée, l'hypothalamus de Rat a synthétisé par heure 20 à 25 pg soit 9 à 11  $\mu\text{U}$  d'hormone marquée. Une évaluation similaire effectuée sur les données d'incorporation de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine chez la Brebis aboutit (en tenant compte des écarts de nos résultats et du fait qu'une ou 2 molécules de cystéine marquée peuvent entrer dans la composition de la vasopressine et de l'ocytocine) à une synthèse de 6 à 75 mU/heure, chez la Brebis. Par ailleurs, l'incorporation de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine ainsi évaluée est probablement sous-estimée par le fait que la vitesse d'incorporation est plus rapide pendant les 8 à 10 premières heures suivant l'injection (le prélèvement de l'hypophyse de Brebis n'a eu lieu que 24 heures après l'injection).

De cette comparaison, en tenant compte des relations pondérales entre les animaux d'expérience, il semble que nous puissions conclure à une meilleure incorporation de la  $^{35}\text{S}$ -cystéine dans les peptides hormonaux de la neurohypophyse que la tyrosine tritiée.

Notons enfin que les raisons de l'absence de marquage dans la tige pituitaire restent peu claires, aussi bien chez le Rat (FLAMENT-DURAND, 1966) que chez la Brebis; NÖRSTRÖM et SJÖSTRAND (1971) montrent cependant que la radioactivité de la tige pituitaire peut être détectée par des techniques biochimiques, mais qu'elle apparaît fugace et maximum 2 heures après l'injection intracrânienne avant de décroître rapidement. Il semble donc normal, si l'on se réfère à la faible sensibilité des techniques autoradiographiques, que l'on ne puisse trouver de radioactivité dans la tige pituitaire 24 heures après l'injection de  $^{35}\text{S}$ -cystéine. Une synthèse d'hormone ne paraissant pas possible dans la posthypophyse seule (TAKABA-

TAKE et SACHS, 1964 ; INONE et SATO, 1966 ; PICKERING et JONES, 1970), le flux de neurosécrétat radioactif doit donc transiter par le tractus hypothalamo-hypophysaire, comme le montrent les expériences de section de la tige pituitaire (STUTINSKY, 1955 ; FLAMENT-DURAND, 1966). Toutefois sa mise en évidence sur un animal normal ne doit être possible qu'avec des techniques biochimiques plus sensibles que les autohistoriographies.

*Reçu pour publication en juillet 1973*

## SUMMARY

### STUDY OF POSTPITUITARY HORMONE BIOSYNTHESIS IN EWES AFTER $^{35}\text{S}$ -CYSTEINE INJECTION

The process of neurosecretion in the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus was studied by autohistoriographic techniques after intraventricular injection of  $^{35}\text{S}$  cysteine.

Practised in almost identical conditions in the ewe, this experiment gave comparable results: 2 hours after the injection, selective labelling of paraventricular and supraoptic nuclei - no post-pituitary labelling.

However, conclusions on the dynamics of postpituitary hormone biosynthesis cannot be drawn from this technique. Thus, the authors extracted the radioactive hormonal part, synthesized by supraoptic and paraventricular nuclei in transit towards the neurohypophysis in the normal ewe slaughtered 24 hours after intraventricular injection of 2 mCi of  $^{35}\text{S}$ -cysteine.

The amount of this secretion is of the order of 6 to 75 mU (oxytocin + vasopressin) per hour in normal ewe. Labelled cysteine proved to be very good for the study of hypothalamic synthesis of the postpituitary hormones.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACHER R., FROMAGEOT C., 1957. The relationship of oxytocin and vasopressin to active proteins of posterior pituitary origin. Studies concerning the existence or non existence of a single neurohypophysial hormone. In *The Neurohypophysis*, p. 38. Ed. Heller, London, Butterworths.
- ACHER R., LIGHT A., du VIGNEAUD V., 1958. Purification of oxytocin and vasopressin by way of a protein complex. *J. Biol. Chem.*, **233**, 116-119.
- BRESLOW E., ABRASH L., 1966. The binding of oxytocin and oxytocin analogues by purified bovine neurophysins. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **56**, 640-646.
- CLOUET D.-H., RICHTER D., 1959. The incorporation of  $^{35}\text{S}$  labelled methionine into the proteins of the rat brain. *J. Neurochem.*, **3**, 219-229.
- DEKANSKI J., 1952. The quantitative assay of vasopressin. *Brit. J. Pharmacol.*, **7**, 567-572.
- DICKER S.-E., TYLER C., 1953. Vasopressor and oxytocic activities of the pituitary glands of rats, guinea-pigs and cats and of human foetuses. *J. Physiol. (London)*, **121**, 206-214.
- FLAMENT-DURAND J., 1961. Études des relations hypothalamo-hypophysaires à l'aide de radio-isotopes marqués au soufre 35. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **252**, 3487-3489.
- FLAMENT-DURAND J., 1966. Contribution à l'étude des relations hypothalamo-hypophysaires. *Ann. Soc. Roy. Sci. Med. Bruxelles*, **19**, 6-119.
- GAITONDE M.-K., RICHTER D., 1955. The uptake of  $^{35}\text{S}$  into rat tissues after injection of  $^{35}\text{S}$ -methionine. *Biochem. J.*, **50**, 690-696.
- GAITONDE M.-K., RICHTER D., 1956. The metabolic activity of the proteins of the brain. *Proc. Roy. Soc., B*, **145**, 83-99.
- GINSBURG M., IRELAND M., 1964. Binding of vasopressin and oxytocin to protein in extracts of rabbit and bovine neurohypophyses. *J. Endocr.*, **30**, 131-145.
- GINSBURG M., IRELAND M., 1965. The preparation of bovine neurophysin and the estimate of its maximum capacity to bind oxytocin and arginine vasopressin. *J. Endocr.*, **32**, 187-198.

- INOUE S., SATO N.-L., 1966. Uptake of radioactive leucine and uridine by the caudal neurosecretory cell of the loach (*Misgurnus anguillicandatus*). *Endocr. Jap.*, **13**, 464-468.
- LOWRY O.-H., ROSEBROUGH H. J., FARR A.-L., RANDALL R.-J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MARTINET J., FLAMENT-DURAND J., 1969. Étude de la neurosécrétion par incorporation d'acides aminés marqués. *Colloques nationaux du C. N. R.S. Paris Neuroendocrinologie*, publ. J. Benoit et C. Kordon, 1970, p. 315-324.
- MORGAT J.-L., HUNG L.-T., CARDINAUD R., FROMAGEOT P., BOCKAERT J., IMBERT M., MOREL F., 1970. Peptidic hormone interaction at the molecular level; preparation of highly labelled H<sup>3</sup> oxytocin. *J. Labelled Compounds*, **6**, 275-284.
- NORSTRÖM A., SJÖSTRAND, J., 1971. Axonal transport of proteins in the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *J. Neurochem.*, **18**, 29-39.
- PICKERING B.-T., JONES C.-W., 1970. The isolation of labelled neurohypophysial hormones from rat neural lobes after an intracisternal infection of H<sup>3</sup> tyrosine. *J. Endocr.*, **46**, VI.
- PICKERING B.-T., JONES C.-W., 1971. Isolation of radioactive oxytocin and vasopressin from the posterior pituitary gland of the rat after the injection of labelled tyrosine into the cerebrospinal fluid. *J. Endocr.*, **49**, 93-103.
- PORTANOVA R., SACHS H. 1967. A specific adsorbent for vasopressin: The purification of labelled hormone. *Endocrinology*, **80**, 527-529.
- REINDEL F., HOPPE W., 1954. Über ein Färbemethode zum Anfärben von Aminosäure, Peptiden und Proteinen auf Papierchromatogrammen und Papier-elektropherogrammen. *Chem. Berichte.*, **87**, 1103-1107.
- ROUX M., 1968. Étude histoautoradiographique du lobe nerveux de l'hypophyse après l'injection d'acides aminés marqués chez la souris albinos. *C. R. Assoc. Anatomistes (Nancy)*, **137**, 1435-1440.
- SACHS H., TAKABATAKE Y., 1964. Evidence for a precursor of vasopressin biosynthesis. *Endocrinology*, **75**, 943-948.
- SLOPER J.-C., 1958. The application of newer histochemical and isotope techniques for the localisation of protein-bound cystine or cysteine to the study of hypothalamic neurosecretion in normal and pathological conditions. *Zweites Internationales Symposium über Neurosekretion*, p. 20, Springer, Berlin.
- SLOPER J.-C., ARNOTT D.-J., KING B.-C., 1960. Sulphur metabolism in the pituitary and hypothalamus of the rat: A study of radioisotope-uptake after the injection of <sup>35</sup>S-DL cysteine, methionine and sodium sulphate. *J. Endocr.*, **20**, 9-23.
- STUTINSKI F., 1953. La neurosécrétion au cours de la gestation et le postpartum chez la Ratte. *Ann. Endocr.*, (Paris), **14**, 722-727.
- STUTINSKY F., 1955. Effets de l'hypophysectomie totale ou partielle sur la neurosécrétion hypothalamique du Rat. *C. R. Assoc. Anatomistes (Nancy)*, **92**, 1256-1266.
- TAKABATAKE Y., SACHS H., 1964. Vasopressin biosynthesis, III. In vitro studies. *Endocrinology*, **75**, 934-942.
- TAGUCHI S., KOBAYASHI H., FARNER D. S., 1966. Observations on the uptake of <sup>35</sup>Sulphur by the hypothalamo-hypophysial system of the white crowned sparrow (*Zonotrichia Leucophrys Gambelii*) following intraventricular injection of <sup>35</sup>S-DL cysteine. *Z. Zellsforsch.*, **69**, 228-245.
- VILHART H., 1970. Vasopressin content and neurosecretory material in the hypothalamo-neurohypophysial system of rats under different states of water metabolism. *Acta Endocr. (Kbh)*, **63**, 585-594.
-