

Caracterisation Partielle d'un Facteur Hypothalamique de Liberation des Hormones Gonadotropes Chez la Carpe (*Cyprinus carpio* L.) Etude *in Vitro*

BERNARD BRETON, BERNARD JALABERT, ET CLAUDINE WEIL
AVEC LA COLLABORATION TECHNIQUE DE MADAME PIERRETTE REINAUD

*Institut National de la Recherche Agronomique,
C.N.R.Z., Laboratoire de Physiologie des Poissons,
78350 Jouy en Josas, France*

Accepted October 22, 1974

L'influence de différents facteurs sur la sécrétion *in vitro* d'hormone gonadotrope par des hypophysés de Carpe a été étudiée grâce au choix d'un milieu d'incubation favorable. Après filtration sur Séphadex G 25 d'extraits acides réalisés, soit à partir d'hypothalamus, soit à partir de neurohypophysés, une activité de type "releasing factor" a été mise en évidence dans des fractions correspondant à un poids moléculaire inférieur à 5,000. Cette activité se distingue d'une part de celle de l'ocytocine et de la vasopressine et d'autre part de celle de neuroamines: adrénaline, noradrénaline, sérotonine et dopamine, qui ne montrent pas d'activité stimulante propre sur la sécrétion gonadotrope *in vitro*. Par ailleurs, la sécrétion de "releasing factor" *in vitro* par des morceaux d'hypothalamus ne paraît pas stimulée de façon significative par l'adjonction de dopamine.

Ces résultats confirment l'existence chez les Poissons d'un facteur hypothalamique actif sur la sécrétion gonadotrope, qui pourrait dans l'état actuel des données existantes, être comparable au LH/FSH-RH des Mammifères par sa propriété de stimuler la sécrétion de c-GtH par l'hypophyse.

The influence of different factors on *in vitro* secretion of carp pituitary gonadotrophin has been studied in a specific incubation medium. After gel filtration of acid extracts of hypothalamus and neurohypophysis on Sephadex G 25, a "releasing factor" type activity was found in fractions having a molecular weight less than 5000. This activity is different from that of oxytocin, vasopressin and the neuroamines, adrenalin, noradrenalin, serotonin and dopamine which do not stimulate gonadotrophin release from carp pituitary *in vitro*.

Hypothalamic secretion *in vitro* of "releasing factor" is not increased when dopamine is added.

These results confirm the existence of a hypothalamic factor which stimulates pituitary gonadotrophin secretion. The possible similarity between this factor and mammalian LH/FSH-RH is discussed.

Chez les Poissons téléostéens comme chez les vertébrés supérieurs, la fonction gonadotrope hypophysaire semble être sous le contrôle de l'hypothalamus. En effet, de nombreux travaux mettent en évidence une relation fonctionnelle entre le système nerveux central et la fonction gonadotrope.

Chez *Poecilia reticulata*, dans l'hypo-

physe déconnectée de l'hypothalamus, les cellules basophiles considérées comme gonadotropes dégénèrent totalement, tandis que les cellules à prolactine restent fonctionnelles (Ball *et al.*, 1965). Il en est de même chez l'Anguille (Olivereau, 1969). Chez le Poisson rouge *Carassius auratus* (Peter, 1970, 1973) la lésion du noyau latéral du tuber (NLT) entraîne une

diminution de l'activité de la gamétogénèse. Chez *Barbus tor* la charge du matériel neurosécrétoire du noyau pré-optique (NPO) et du NLT est en phase avec celle des cellules gonadotropes hypophysaires au cours du cycle reproducteur: accumulation importante en période d'ovogénèse et décharge brutale au moment de la fraie (Rai, 1973). Dans le NLT Honma et Tamura (1967) ont pu mettre en évidence des variations de la granulation des fibres neurosécrétrices au cours du cycle reproducteur chez *Salvelinus leucomaenis pluvius*. Enfin chez *Zoarces viviparus* Öztan (1966) a fait les mêmes observations; de plus des animaux placés sous éclairage continu en avril, période normale de faible charge en matériel neurosécrétoire, présentent une charge équivalente à celle de la période de fraie en septembre, alors que la situation est inversée en plaçant des animaux à l'obscurité en septembre.

Par contre il n'existe que peu de données concernant la nature des sécrétions hypothalamiques agissant sur l'hypophyse; seuls des renseignements histo-chimiques indiquent que le matériel sécrété par certaines fibres hypothalamiques serait de nature peptidique (Abraham, 1973), mais cependant aucune preuve directe ne permet de lui attribuer un rôle physiologique de type LH/FSH-RH comme le fait Rai (1973).

Nous avons démontré la présence dans

l'hypothalamus de la Carpe d'un facteur stimulant la sécrétion d'hormone gonadotrope par des hypophyses de Carpe *in vivo* (Breton et Weil, 1973) et *in vitro* (Breton *et al.*, 1971; 1972).

Nous apportons dans ce travail des précisions sur la nature de ce facteur.

MATERIEL ET METHODES

Toute l'expérimentation a été réalisée sur des carpes communes (*Cyprinus carpio* L.), variété miroir, originaire d'un étang de la Brenne, d'un poids moyen de 1 kg, mâles et femelles.

Incubation in Vitro

Aussitôt après décapitation des animaux, les hypophyses prélevées sont placées dans une solution physiologique isotonique à 4°. Une partie de la neurohypophyse est séparée de l'adénohypophyse par dissection sous loupe binoculaire. L'adénohypophyse est alors coupée sagittalement. Puis les demi-hypophyses sont placées séparément dans des coupelles de verre contenant 5 ml de milieu d'incubation. L'une des demi-hypophyses sert de témoin, l'autre est traitée par les substances à tester.

Les conditions d'incubation permettant d'obtenir des réponses homogènes et répétables ont été recherchées.

Le KRB couramment utilisé pour des incubations de tissus de Mammifères et conçu pour être tamponné sous atmosphère de 5% de CO₂ à 37°, nous a semblé mal adapté à l'incubation de tissus de Poissons (poikilothermes dont la température corporelle et la tension en CO₂ dissout du sang sont inférieures). C'est pourquoi nous avons essayé deux autres types de milieux.

MMH, milieu minéral préparé à partir des données de Houston et Madden (1968) (Tableau 1) sur la composition de plasma de Carpes acclimatées pendant plus de 3 semaines à 27°. Ce milieu a été tam-

TABLEAU 1
CONCENTRATION DES PRINCIPAUX CATIONS DANS LE PLASMA DES CARPES UTILISÉES POUR NOS
EXPÉRIENCES (QUELQUES JOURS SEULEMENT APRÈS TRANSPORT ET STOCKAGE À 15°^a)

	Plasma des carpes placées dans nos conditions expérimentales (21 échantillons)	Plasma des carpes acclimatées à 27°C (d'après Houston et Madden, 1968) (13 échantillons)
Na mM/liter	134 ± 22	137.3 ± 2.3
K mM/liter	8.90 ± 1.18	2.39 ± 0.19
Mg mM/liter	1.63 ± 0.07	1.21 ± 0.05
Ca mM/liter	4.16 ± 0.19	2.44 ± 0.10

^a Comparée aux valeurs fournies par Houston et Madden (1968) pour le plasma de Carpes acclimatées à 27° pendant plus de trois semaines (valeurs moyennes ± 1 erreur standard).

ponné par du bicarbonate de sodium sous atmosphère contenant 1% CO₂, 49% O₂ et 50% N₂.

MMC, milieu minéral "Carpe" préparé d'après des résultats d'analyses effectuées sur le plasma de nos propres animaux expérimentaux (Tableau 1). (Le sang est prélevé sur héparinate d'ammonium. Après minéralisation du plasma, sa composition ionique a été déterminée par spectrophotométrie de flamme.) Ces valeurs paraissent anormales par rapport à celles de Houston et Madden, probablement à cause du transport récent et de l'état de stress des animaux. La différence fondamentale entre ces milieux réside dans leur teneur en K⁺, élément dont l'absence peut s'avérer limitante dans les phénomènes de sécrétion *in vitro*. C'est pourquoi nous avons cherché à savoir si de telles différences pouvaient jouer un rôle important dans nos incubations d'hypophyses. Ce milieu a été tamponné selon deux modalités: soit par le bicarbonate de sodium, dans les mêmes conditions que le MMH, sous 1% CO₂ (MMCb), soit par le système Tris-HCL 0.02 M sous atmosphère normale (MMCt).

La température d'incubation choisie est de 20°.

*Substances Testées pour leur
Activité Stimulante sur la
Sécrétion Gonadotrope
Hypophysaire*

Pour apporter des précisions sur la nature du facteur de stimulation hypothalamique, nous avons utilisé 2 types de

préparations préparées à partir d'hypothalamus et de neurohypophyses de Carpes par filtration sur gel sephadex G 25.

Les tissus hypothalamiques et neurohypophysaires sont prélevés dans l'azote liquide, puis transformés en poudre acétonique par broyage et agitation dans l'acétone froid à 4°. Les deux types de poudres obtenues sont soumis à extraction par l'acide acétique 2 N, 24 hr à 4°. Après centrifugation, les deux surnageants sont lyophilisés et sont fractionnés séparément sur la même colonne de séphadex G 25. L'élution est pratiquée par de l'acide formique 0.1 M.

Le diagramme d'élution montre deux pics composites principaux dans les deux cas (Fig. 1). Les fractions correspondant à ces deux pics sont réunies séparément et lyophilisées (fraction A et B). Les 4 échantillons ainsi obtenus ont été utilisés à la dose de 2 µg/ml de milieu.

En utilisant les tests de la variation de pression artérielle (Dekanski, 1952) et de la contraction de la mamelle de ratte *in vitro* (Smith, 1961), nous avons mis en évidence des activités de type vasopres-

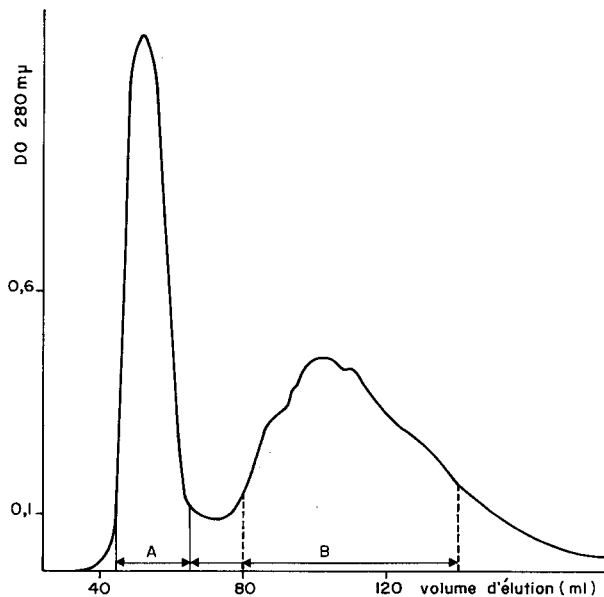


FIG. 1. Diagramme d'élution d'un extrait acide de neurohypophyse de Carpe sur séphadex G 25 en acide formique 0.1 M, colonne 1.5 × 60 cm.

sique et ocytocique dans la fraction B de l'extrait neurohypophysaire. Ces activités sont de l'ordre de 0.5 IU/ml d'extrait dans les deux cas. L'action des préparations obtenues a donc été comparée à celle de l'ocytocine et de la vasopressine Sandoz aux doses de 0.1 et 1 IU/ml de milieu.

L'effet de certaines neuroamines sur la stimulation de la sécrétion gonadotrope a en outre été étudié. Les amines suivantes ont été utilisées (il s'agit de produits Koch et Light):

Dopamine seule aux doses de 100-10-5 et 1 $\mu\text{g/ml}$ de milieu;

Dopamine en présence de fragments d'hypothalamus de Carpe à la dose de 5 $\mu\text{g/ml}$;

Adrénaline aux doses de 100-5 et 1 $\mu\text{g/ml}$ de milieu;

Noradrénaline aux doses de 5 et 1 $\mu\text{g/ml}$;

Sérotonine aux doses de 5 et 1 $\mu\text{g/ml}$.

La concentration en hormone gonadotrope (c-GtH) de chaque milieu après incubation a été déterminée par dosage radioimmunologique selon la technique déjà

décrite (Breton *et al.*, 1971b). La méthode utilisée permet de bonnes déterminations de la c-GtH dans un milieu, dans une gamme comprise entre 0.3 et 100 ng/ml. Les milieux d'incubation à doser ont donc été dilués 5 ou 10 fois afin d'obtenir des valeurs incluses dans cette gamme. La détermination de l'activité des facteurs cités a été réalisée chaque fois sur des lots de 10 demi-hypophyses témoins et expérimentales.

Expression des Résultats

La sécrétion de chaque demi-hypophyse est caractérisée par un coefficient, S^1 , rapport de la quantité d'hormone sécrétée pendant l'incubation finale en présence ou non de produit à tester, à la quantité d'hormone sécrétée pendant une incubation précédente de même durée, et en l'absence de tout traitement. La comparaison de ces coefficients entre demi-hypophyses témoins et traitées met en évidence l'activité de la substance analysée.

$S = 1$ correspondrait théoriquement à un taux de sécrétion constant d'une période d'incubation à la suivante.

TABLEAU 2
COMPOSITION ET CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS MILIEUX D'INCUBATIONS UTILISÉS^a

	Krebs-Ringer bicarbonate KRB	M.M.H. bicarbonate	M.M.C.	
			Tampon bicarbonate M.M.Cb	Tampon Tris-HCl M.M.Ct
NaCl (g/liter)	6.92	7.30	7.04	6.80
KCl (g/liter)	0.43	0.18	0.67	0.58
MgSO ₄ (7H ₂ O) g/liter	0.30	0.07	0.07	0.07
MgCl ₂ (6H ₂ O) g/liter		0.18	0.26	0.22
CaCl ₂ (2H ₂ O) g/liter	0.37	0.35	0.61	0.54
NaH ₂ PO ₄ g/liter	0.14	0.08	0.24	0.24
NaH CO ₃ g/liter	2.1	1	1	1
Glucose g/liter	2	1	1	1
Tampon Tris-HCl	—	—	—	100 ml tampon 0.2 M/liter
Atmosphère	O ₂ 95%—CO ₂ 5%	O ₂ 49%; CO ₂ 1%; N ₂ 50%	O ₂ 49%; O ₂ 1%; N ₂ 50%	normale
pH à 25°	7.2—7.4	7.4—7.6	7.4—7.6	7.5
p.o. mesurée	290	275	285	290

^a Le milieu M.M.H. respecte sensiblement la balance des cations du plasma de Carpe d'après les valeurs de Houston et Madden, et les milieux M.M.C. sont reconstitués d'après nos propres valeurs (Tableau 1).

Les résultats ont été comparés par analyse de variance.

RESULTATS

Influence de la composition du milieu d'incubation sur la sécrétion gonadotrope *in vitro*

La composition des différents milieux est donnée dans le tableau 2. Les taux de sécrétion gonadotrope des demi-hypophyses *in vitro* ont été suivis pendant 6 hr, les milieux étant changés toutes les 90 min. Les quantités de c-GtH secrétées, par ml de milieu, ramenées au milligramme d'hypophyse fraîche, sont représentées sur la Fig. 2.

On constate que dans le milieu Kreb Ringer-bicarbonate (KRB) et le milieu physiologique de Carpe tamponné au Tris (MMCT), les niveaux de sécrétion restent hétérogènes après 6 hr d'incubation et trois changements de milieu. Au contraire, dans le milieu tamponné par du bicarbonate (MMCb) les taux de sécrétion sont beaucoup plus homogènes, et à un degré moindre dans le MMH.

Dans le MMcB, les niveaux de sécrétion restent stables après deux renouvellements, c'est-à-dire après 3 hr d'incubation. L'addition d'un extrait hypothalamique dans le milieu d'incubation au 3ème changement de milieu (Fig. 3) se traduit par une élévation homogène des taux de sécrétion gonadotrope hypophysaire dans le milieu reconstitué MMcB, alors qu'en tampon Tris-HCl cette élévation reste hétérogène. Nous avons donc adopté le milieu minéral reconstitué, tamponné au bicarbonate (MMCb).

Influence de la fréquence des changements de milieu

Nous venons de voir qu'après changement de milieu toutes les 90 min, les niveaux de sécrétion se stabilisent après 3

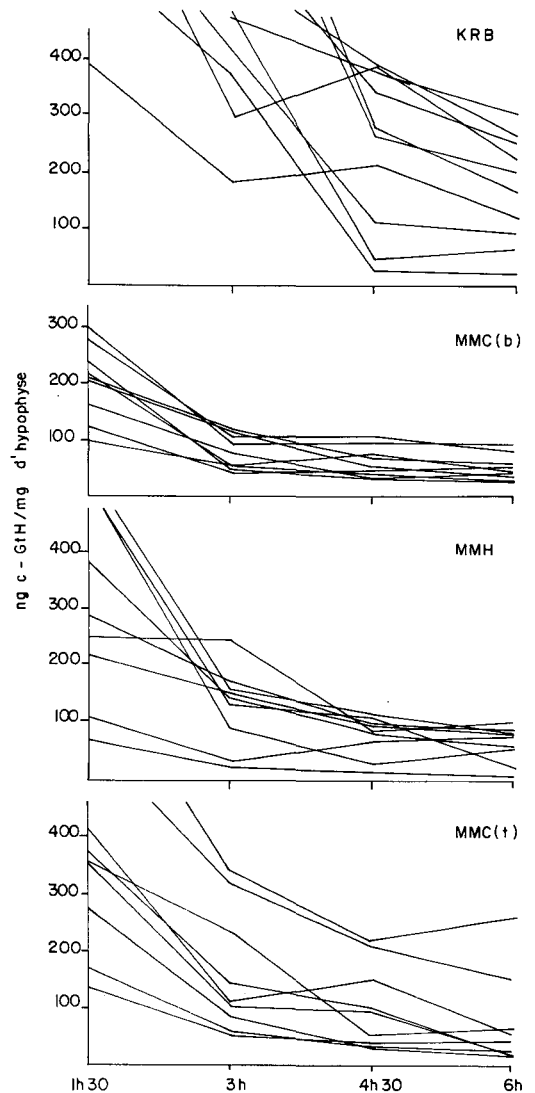


FIG. 2. Effet de différents milieux isotonique d'incubation sur la sécrétion de c-GtH *in vitro* par des demi-hypophyses de Carpe. Chaque courbe représente l'évolution de la sécrétion d'une demi-glande.

hr. Sur la Fig. 4 sont portés les résultats obtenus par renouvellement toutes les 30 et 60 min. Quelle que soit la fréquence de changement de milieu, on retrouve la stabilisation des taux de sécrétion après 3 hr d'incubation.

Cependant quand la fréquence est de 30 min, on constate de légères fluctuations des niveaux, bien qu'ils soient homogènes dans l'ensemble.

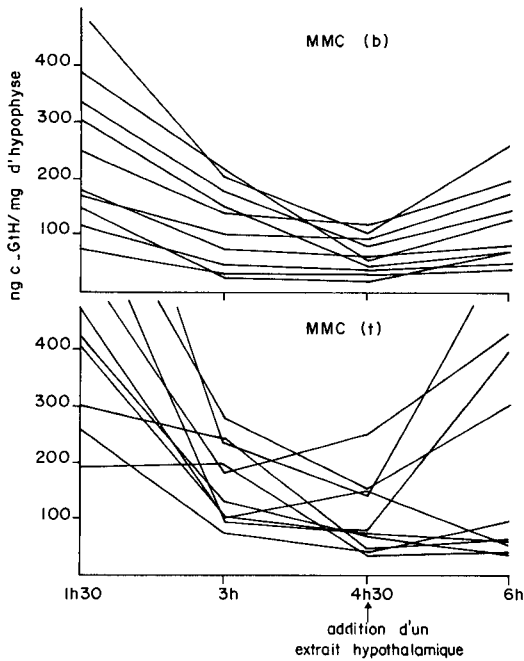


FIG. 3. Effet de l'addition d'extrait hypothalamique sur la sécrétion de c-GtH *in vitro* dans un milieu minéral carpe tamponné au bicarbonate M.M.Cb et au Tris M.M.Ct.

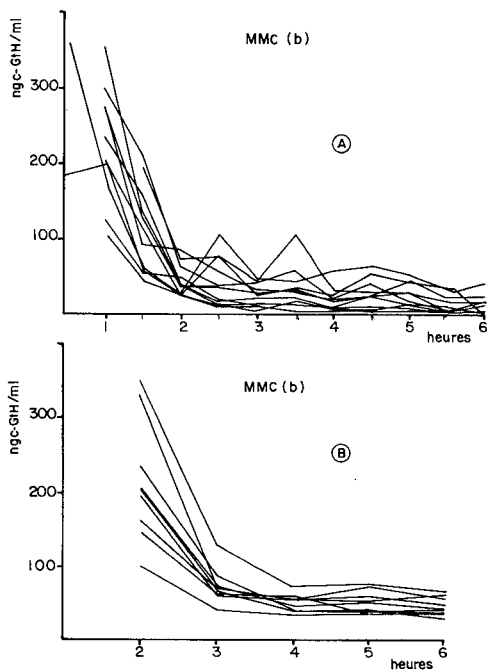


FIG. 4. Effet de la fréquence des changements de milieu sur la sécrétion de c-GtH *in vitro*: A, changement toutes les 30 min.; B, changement toutes les 60 min.

Etude de la sécrétion hypophysaire *in vitro* sous l'influence de différents facteurs hypophysaires et hypothalamiques

Extraits Hypothalamiques et Neurohypophysaires

Les fractions A obtenues après filtration sur gel séphadex G 25 des extraits acides hypothalamiques et neurohypophysaires n'ont pas provoqué de stimulation de la sécrétion gonadotrope hypophysaire *in vitro*. Par contre, les fractions B à la dose de $2 \mu\text{g/ml}$ de milieu entraînent une stimulation. Les coefficients de sécrétion passent respectivement de 0.82 ± 0.25 à 1.52 ± 0.53 et 1.43 ± 0.36 avec la préparation hypothalamique, et de 0.77 ± 0.19 à 1.94 ± 0.35 et 1.67 ± 0.41 avec la préparation neurohypophysaire.

Il n'y a pas de différence statistique entre deux répétitions de la même préparation et entre les effets des deux extraits à la même dose.

Les contrôles de l'activité propre de l'ocytocine et de la vasopressine n'ont pas donné de résultats positifs (Fig. 6) aux doses de 0.1 et 1 IU/ml de milieu.

Action des Neuroamines

1. *Dopamine*. Quelle que soit la dose utilisée, la dopamine ne présente pas en elle-même d'activité stimulante sur la sécrétion gonadotrope *in vitro* (Fig. 7). Son action a aussi été testée sur la libération de "releasing factor" à partir d'hypothalamus *in vitro*. Dans ce but des demi-hypophyses de Carpe ont été incubées en présence d'hypothalamus en morceaux avec addition ou non de dopamine à la dose de $5 \mu\text{g/ml}$ de milieu.

En l'absence de dopamine deux hypothalamus provoquent une stimulation de la sécrétion de c-GtH de 0.75 ± 0.15 à 1.34 ± 0.39 , alors que le coefficient de sécrétion est porté à 1.82 ± 0.38 (Fig. 8) en présence de dopamine; la différence n'est cependant pas significative au seuil $p = 0.05$.

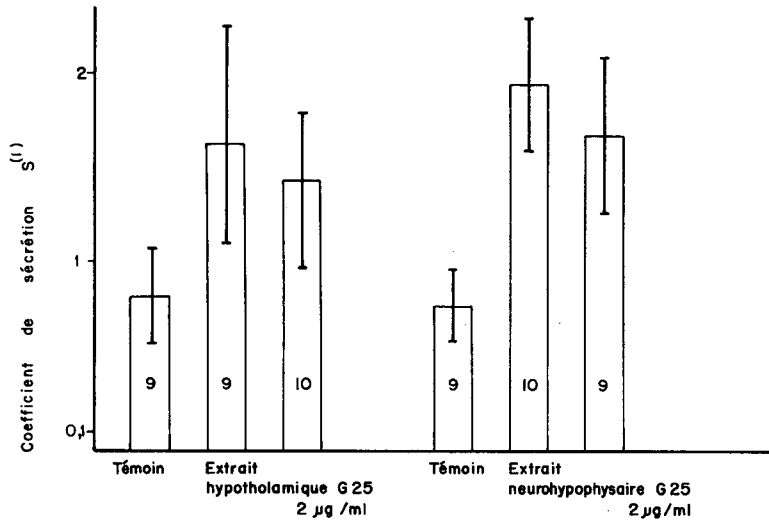


FIG. 5. Comparaison des effets des extraits hypothalamiques et neurohypophysaires après filtration sur séphadex G 25 (intervalle de confiance $p = 0.05$). Le chiffre à l'intérieur des histogrammes représente le nombre de demi-glandes par essai.

2. *Les autres amines utilisées.* Adrénaline, noradrénaline, sérotonine n'ont pas montré d'activité stimulante sur la sécrétion gonadotrope *in vitro*. Les effets de ces amines n'ont pas été testés en présence d'hypothalamus.

tissu hypophysaire de Carpe a permis d'obtenir une homogénéité plus importante des taux de sécrétion hypophysaire *in vitro*, alors que l'utilisation de divers autres milieux parmi lesquels le KRB conduisent à des résultats plus hétérogènes, difficiles à analyser.

DISCUSSION

Milieu d'incubation

L'utilisation d'un milieu d'incubation spécifique (MMCb) qui paraît adapté au

Le milieu MMCb réalisé fortuitement d'après l'analyse de plasma de Carpe en état de stress diffère par ses composantes K^+ et Ca^{2+} à la fois du KRB classiquement utilisé pour l'incubation de tissus de Mam-

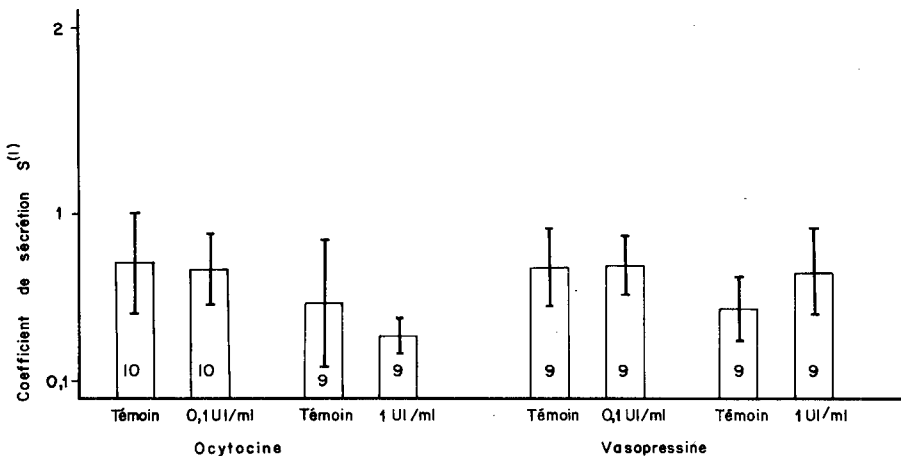


FIG. 6. Effet de l'ocytocine et de la vasopressine sur la sécrétion de c-CtH *in vitro* (intervalle de confiance $p = 0.05$).

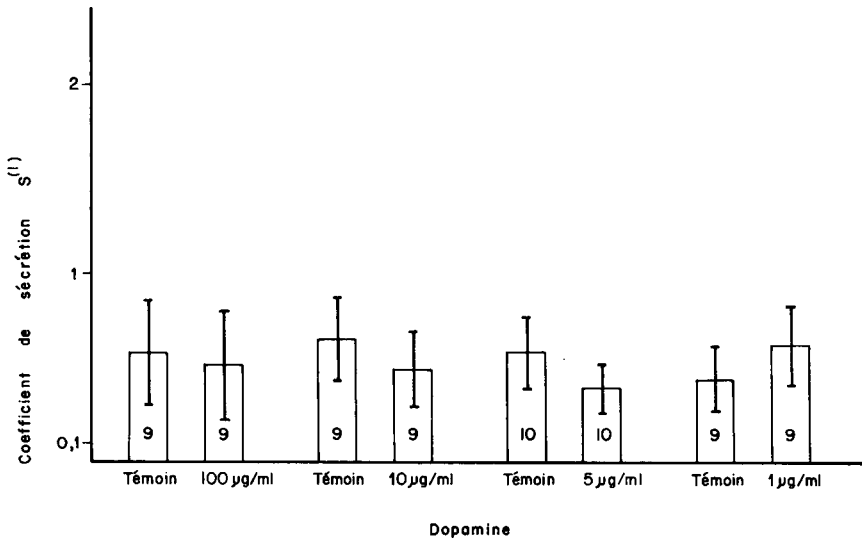


FIG. 7. Effet de la dopamine sur la sécrétion de c-GtH *in vitro* (intervalle de confiance $p = 0.05$).

mifères et aussi, en fait, des teneurs physiologiques trouvées par Houston et Madden (1968) chez la Carpe. Or, si l'on pouvait attendre qu'un milieu optimum pour un tissu hypophysaire de Poisson soit différent du KRB, il est *a priori* plus surprenant de constater que l'équilibre ion-

ique du MMCb ne corresponde pas aux valeurs plasmatiques physiologiques normales de la Carpe. Il nous semble en fait que cette observation révèle effectivement que les conditions requises pour le fonctionnement normal d'un organe incubé *in vitro* dans des conditions de survie à court terme ne correspondent pas forcément à l'équilibre plasmatique.

Chez le Rat, la présence de Ca^{2+} est nécessaire à l'action du FSH-RH *in vitro* (Wakabayashi *et al.*, 1969); son absence fait disparaître l'activité du FSH-RH sur la synthèse de la FSH. D'autre part, le potassium favorise la sécrétion de LH et FSH, mimant le LH-FSH/RH (Jutisz et de la Llosa, 1970). En présence d'EDTA ou en l'absence de Ca^{2+} , cette action intrinsèque du potassium disparaît (Wakabayashi et McCann, 1970).

L'un de nous (Weil, 1972) a pu démontrer que la stimulation optimale par le K^+ était obtenue dans du KRB contenant 7.05 mM/litre, c'est-à-dire une concentration en K^+ proche de la valeur de 8,90 mM/litre dans le plasma pourrait éventuellement être un facteur limitant. Ainsi l'ajustement des teneurs en K^+ et Ca^{2+} du milieu d'incubation à des valeurs aussi

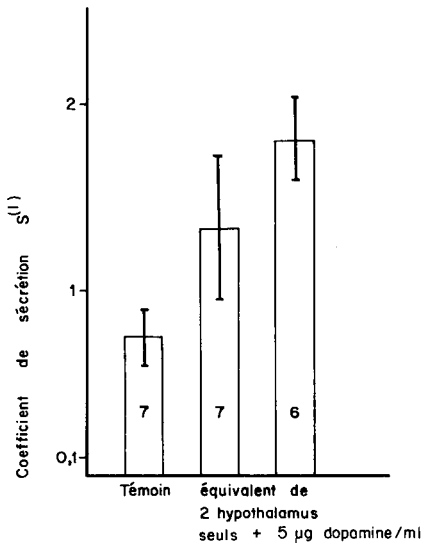


FIG. 8. Stimulation *in vitro* de la sécrétion gonadotrope hypophysaire c-GtH par du tissu hypothalamique en présence ou non de dopamine à la dose de 5 µg/ml (intervalle de confiance $p = 0.05$).

TABLEAU 3
COMPOSITION EN CATIONS DES DIFFÉRENTS
MILIEUX UTILISÉS (m M/liter)

	KRB	MMH	MMC(b)	MMC(t)	Plasma de Carpe
Na ⁺	143.4	137.28	134.5	118.36	134.5
K ⁺	5.87	2.40	8.9	7.78	8.9
Mg ²⁺	1.24	1.20	1.6	1.38	1.6
Ca ²⁺	2.52	2.40	4.15	3.67	4.16

proches que possible de leurs concentrations dans le plasma des animaux paraît indispensable à l'obtention de taux de sécrétion reproductibles d'une hypophyse à l'autre.

Les fluctuations des niveaux de sécrétion observées lors des changements de milieu toutes les 30 min pourraient être dues à des variations du pH du milieu bicarbonaté qui n'a pas le temps d'atteindre sa valeur d'équilibre dans l'atmosphère d'incubation à 1% de CO₂.

Nature du facteur de stimulation hypothalamique

Après passage sur séphadex G 25 des extraits hypothalamique et neurohypophysaire, seules les fractions B se sont révélées actives. Ces fractions correspondent à un ensemble de molécules d'un poids moléculaire inférieur à 5,000. L'allure du pic d'éluion (Fig. 1) laisse supposer au moins 4 composantes dans les fractions B parmi lesquelles nous avons pu mettre en évidence les activités pressiques et ocytociques, et l'activité de type "releasing factor." Les deux hormones neurohypophysaires se sont révélées inactives *in vitro* aux doses utilisées. Il semble donc possible d'écarter l'hypothèse de certains auteurs (Egami et Ishii, 1962) attribuant à ces peptides la fonction de facteurs de stimulation. Cependant les hormones neurohypophysaires mammaliennes diffèrent de celles de Carpe par un résidu d'acide aminé (Acher *et al.*, 1965), et une conclusion définitive sur l'action de ces

deux hormones sur la sécrétion hypophysaire gonadotrope chez la Carpe ne pourra être tirée qu'après essai des hormones neurohypophysaires spécifiques de l'espèce. Le facteur hypothalamique agissant sur la sécrétion gonadotrope hypophysaire *in vitro* est différent de la dopamine, de l'adrénaline, de la noradrénaline et de la sérotonine. Dans des études sur l'ultrastructure du complexe hypothalamo-hypophysaire des poissons, de nombreux auteurs ont décrit des contacts neurocellulaires et neurovasculaires d'origine hypothalamiques (Knowles et Vollrath, 1966), autour des cellules de l'antéhypophyse certaines de ces fibres étant de nature aminergique (Zambrano, 1971).

Zambrano (1973) ainsi qu'Abraham (1973) attribuent un rôle prépondérant à ces terminaisons aminergiques dans la décharge des hormones antéhypophysaires; pour Olivereau (1971) les terminaisons sérotoninergiques seraient plus particulièrement impliquées dans le contrôle de la sécrétion prolactinique chez l'Anguille.

Nos résultats n'excluent pas une action *in vivo* indirecte des amines.

Ils ne permettent pas non plus de démontrer l'existence d'un mécanisme dopaminergique contrôlant la sécrétion du Gn-RH comme cela a été démontré pour le LH-FSH-RH chez le rat *in vitro* (Kamberi et McCann, 1969, 1970) et *in vivo* (Kamberi *et al.*, 1971).

Les deux préparations hypothalamique et neurohypophysaire obtenues après passage sur Séphadex G 25 ont montré des activités de type gonadotropes "releasing factor" équivalentes. Dès 1928, Scharrer avait émis l'hypothèse de l'équivalence physiologique de la neurohypophyse et de l'hypothalamus chez les poissons où les fibres neurosecrétices originaires des noyaux préoptique et latéral tubérien pénètrent dans la neurohypophyse.

Nos résultats apportent un support quantitatif et qualitatif à cette hypothèse,

au moins au niveau des sécrétions hypothalamiques de type "releasing factor."

En conclusion, le facteur de stimulation gonadotrope hypophysaire d'origine hypothalamique est d'un poids moléculaire inférieur à 5,000, et diffère de l'ocytocine, de la vasopressine et des neuroamines. Il pourrait être proche du LH/FSH-RH mammalien au moins pour son activité biologique, puisque le LH/FSH-RH synthétique provoque *in vitro* et *in vivo* (Breton et Weil, 1973) une décharge d'hormone gonadotrope importante chez la Carpe et que l'extrait hypothalamique de poisson entraîne une libération de LH de l'hypophyse de Béliet *in vitro* (Breton *et al.*, 1972). La détermination de sa nature biochimique reste à faire et suppose que nous disposions d'une quantité de matériel hypothalamique importante et dont la collecte est actuellement en cours.

REMERCIEMENTS

Nous remercions L. Gueguen de la station de Nutrition I.N.R.A., Jouy en Josas, pour l'analyse des minéraux du plasma de Carpe et J. Martinet de la station de Physiologie de la Lactation I.N.R.A., Jouy en Josas, pour l'aide qu'il nous a apportée dans la détermination des activités ocytocique et vasopressique des extraits hypothalamiques et neurohypophysaires.

Nous remercions également l'Institut National de la Recherche Agronomique et la D.G.R.S.T. (contrat n° 71.7.3025) qui ont supporté ce travail.

REFERENCES

- Abraham, M. (1973). The neurosecretory innervation of the pituitary of *Mugil cephalus* (Teleostei). Abstracts of Paper. 7th Conference of European Comparative Endocrinologists. Budapest, 26-31 août 1973.
- Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M. T., and Crepy, D. (1965). Caractérisation des hormones neurohypophysaires d'un poisson osseux d'eau douce, la Carpe (*Cyprinus carpio*). Comparaison avec les hormones des poissons marins. *Comp. Biochem. Physiol.* **14**, 245-254.
- Ball, J. N., Oliverreau, M., Slicher, A. M., and Kallman, K. (1965). Functional capacity of ectopic pituitary transplants in the teleost *Poecilia formosa* with a comparative discussion on the transplant pituitary. *Phil. Trans. Ser. B. Biol. Sci.* **756**, 69-99.
- Breton, B., Jalabert, B., Billard, R., and Weil, C. (1971a). Stimulation *in vitro* de la sécrétion d'hormone gonadotrope hypophysaire par un facteur hypothalamique chez la Carpe. *C. R. Acad. Sci. Sér. D* **273**, 2591-2594.
- Breton, B., Kann, G., Burzawa, G. E., and Billard, R. (1971b). Dosage radioimmunologique d'une hormone gonadotrope de Carpe (*Cyprinus carpio* L.). *C. R. Acad. Sci. Sér. D* **272**, 1515-1517.
- Breton, B., Weil, C., Jalabert, B., and Billard, R. (1972). Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Béliet et de Poissons téléostéens sur la sécrétion *in vitro* des hormones gonadotropes c-GtH et o-LH respectivement par des hypophysies de Carpe et de Béliet. *C. R. Acad. Sci. Sér. D* **274**, 2530-2533.
- Breton, B., and Weil, C. (1973). Effets du LH/FSH-RH synthétique et d'extraits hypothalamiques de Carpe sur la sécrétion d'hormone gonadotrope *in vivo* chez la Carpe (*Cyprinus carpio* L.). *C. R. Acad. Sci. Sér. D* **277**, 2061-2064.
- Dekanski, J. (1952). The quantitative assay of vasopressin. *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 567-572.
- Egami, E., and Ishii, S. (1962). Hypophysial control of reproductive functions in teleost fishes. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* **1**, 248-253.
- Honma, Y., and Tamura, E. (1967). Studies on Japanese charrs of the genus *Salvelinus*. IV. The hypothalamo-hypophysial vascular system of the Nikko iwana; *Salvelinus leuconaeis pluvius* in relation to its neurosecretory system. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* **33**, 303-310.
- Houston, H. A., and Madden, J. A. (1968). Environmental temperature and plasma electrolyte regulation in the Carp *Cyprinus carpio*. *Nature (London)* **217**, 969-970.
- Jutisz, M., and de la Llosa, P. (1970). Requirement of Ca^{++} and Mg^{++} ions for the *in vitro* release of follicle stimulating hormone from rat pituitary glands and its subsequent biosynthesis. *Endocrinology* **86**, 761-768.
- Kamberi, I. A., and McCann, S. M. (1969). Effects of biogenic amines, FSH releasing factor (FRF) and other substances on the release of FSH by pituitaries incubated *in vitro*. *Endocrinology* **85**, 815-824.
- Kamberi, I. A., Mical, R. S., and Porter, J. C. (1969). Luteinizing hormone releasing activity in hypophysial stalk blood and elevation by dopamine. *Science* **166**, 388-390.
- Kamberi, I. A., Scheiner, H. P. G., and McCann, S. M. (1970). Action of Dopamine to induce release of RSH releasing factor (FRF) from hypothalamic tissues *in vitro*. *Endocrinology* **86**, 278-284.
- Kamberi, I. A., Mical, R. S., and Porter, J. C. (1971). Effects of anterior pituitary perfusion and in-

- traventricular injection of catecholamine on FSH release. *Endocrinology* **88**, 1003-1011.
- Knowles, F., and Vollrath, L. (1966). Neurosecretory innervation of the pituitary of the eel *Anguilla* and *Conger*. II. The structure and innervation of the pars distalis at different stages of the life cycle. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B.* **250**, 329-342.
- Olivereau, M. (1969). Cytologie de l'hypophyse auto-transplantée chez l'Anguille; comparaison avec celle de *Poecilia*. *J. Neuroendocrinol.* **927**, 252-260.
- Olivereau, M. (1971). Action de la réserpine chez l'Anguille. I. Cellule à prolactine de l'hypophyse du mâle. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **121**, 232-243.
- Öztan, N. (1966). The structure of the hypothalamic neurosecretory cells of *Zoarces viviparus* L. under the conditions of constant dark and light during the reproductive cycle. *Z. Zellforsch.* **75**, 66-82.
- Peter, R. E. (1970). Hypothalamic control of thyroid gland activity and gonadal activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **14**, 334-355.
- Peter, R. E. (1973). Neuroendocrinology of teleosts. *Amer. Zool.* **13**, 743-755.
- Rai, B. P. (1973). On the neurosecretory centres in the hypothalamus and their relationship in reproduction in *Tor* (*Barbus*) *tor*. *Acta Anat.* **85**, 429-433.
- Scharrer, R. (1928). Die Lichtempfindlichkeit blinder ebritzen (Untersuchungen über das Zwisch en hum der Fische I). *Z. Physiol.* **7**, 1-38.
- Smith, M. W. (1961). Some properties of rat mammary tissue. *Nature (London)* **190**, 541-542.
- Wakabayashi, K., Kamberi, I. A., and McCann, S. M. (1969). In vitro response of the rat pituitary to gonadotrophin releasing factor and ions. *Endocrinology* **85**, 1046-1056.
- Wakabayashi, K., and McCann, S. M. (1970). In vitro responses of anterior pituitary glands for normal, castrated and androgen. Treated male rats to LH releasing factor (LRF) and high potassium medium. *Endocrinology* **87**, 771-778.
- Weil, C. (1972). Rapport D. E. A. Université de Paris VI.
- Zambrano, D. (1971). The nucleus lateralis tuberis system of the Gobiid fish *Gillichthys mirabilis*. III. Functional modification of the neurons and gonadotropic cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **17**, 164-182.
- Zambrano, D., and Iturriza, F. C. (1973). Hypothalamic hypophysial relationships in the south American Lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **20**, 256-275.