

Séparation chromatographique et dosage de l'arginine-vasotocine et de l'isotocine de l'hypophyse et du noyau préoptique chez l'Anguille de Mer du Nord (*Anguilla anguilla* L.)

Dans des travaux antérieurs nous avons eu l'occasion de constater que chez l'Anguille jaune aussi bien que chez l'Anguille argentée, l'extrait acétique total de noyau préoptique manifeste, comme celui de l'hypophyse, une activité de type ocytocique^{1,2}. Lorsque cet extract est chromatographié on se rend compte que cette activité est due à la présence de 2 substances présentant des propriétés de migration (RF) identiques respectivement à celles de l'arginine-vasotocine (AVT) et de l'isotocine (ICT)^{3,4}. Toutefois, dans la majorité des cas, les concentrations des deux hormones au niveau du noyau préoptique sont très inférieures à celles de ces mêmes hormones au niveau de l'hypophyse¹⁻⁴, fait reconnu pour de nombreuses espèces⁵⁻⁷.

Dans le travail présent nous nous sommes intéressés au dosage de l'AVT et de l'ICT aux niveaux du noyau préoptique et de l'hypophyse chez l'Anguille pêchée en Mer du Nord. Il était en effet digne d'intérêt de savoir si l'augmentation importante du stock d'AVT hypophysaire constatée chez l'Anguille de Mer Baltique⁴ était effectivement en rapport avec la salinité du milieu ambiant. Pour cette raison nous nous sommes adressés à l'Anguille de Mer du Nord, qui se trouve dans un milieu dont la salinité représente pratiquement le double de celle atteinte dans la Mer Baltique.

Protocole expérimental. Animaux. Les Anguilles employées proviennent du port de pêche de Büsum (Schleswig-Holstein). Les animaux, stockés dans de grands bacs alimentés directement par l'eau de Mer du Nord, sont disséqués au fur et à mesure et les cerveaux congelés dès le prélèvement. Un lot de 46 Anguilles femelles argentées (représentant 184 dosages séparés) est utilisé pour ce travail. Le Tableau I résume les principales caractéristiques des animaux. Les différentes fractions (hypophyses et noyaux préoptiques) sont extraites à l'acide acétique, passées au bain-marie à 100 °C, puis centrifugées, selon des techniques précédemment décrites^{3,4}.

Séparations chromatographiques. Elles sont réalisées sur couche mince de poudre de cellulose, dans le système butanol/acide acétique/eau (6/2/2), d'après la méthode habituelle^{3,4}.

Dosages. Les hormones séparées sont dosées au moyen du test biologique de l'utérus de Ratte *in vitro*⁸ en utilisant la solution de Munsick en présence de magnésium⁹, avec l'appareillage précédemment décrit³.

Résultats. Caractéristiques chromatographiques. A partir de l'extrait hypophysaire et à partir de l'extrait de noyau préoptique 2 substances présentant les RF respectifs de l'AVT et de l'ICT (0,15-0,25 et 0,55-0,75) peuvent être mises en évidence.

Teneur en hormones. Les dosages montrent qu'en général les concentrations hormonales trouvées au niveau du noyau préoptique sont nettement inférieures à celles rencontrées pour le niveau hypophysaire⁵⁻⁷. Le Tableau II illustre les valeurs obtenues (présentées sous forme de moyennes) pour les deux territoires considérés. Le Tableau III résume l'analyse statistique (test *t* de Student) effectuée à partir des données du Tableau II.

Discussion et conclusion. L'étude des Tableaux II et III permet un certain nombre de remarques. Au niveau du noyau préoptique on peut constater tout d'abord que la concentration moyenne en arginine-vasotocine est près de trois fois plus importante que celle de l'isotocine (différence «hautement significative»). Pour le territoire hypophysaire on assiste à un fait analogue (la concentration moyenne en arginine-vasotocine est près de quatre fois plus importante que la concentration moyenne en

isotocine), encore qu'il faille remarquer que, comme nous avons déjà eu l'occasion de le voir dans d'autres travaux^{3,4}, ces rapports de concentrations sont susceptibles de variations plus ou moins importantes.

Ce qu'il faut remarquer également c'est l'importance de la concentration moyenne en arginine-vasotocine, concentration qui atteint ici le niveau le plus élevé que nous ayons rencontré jusqu'à présent. Ce fait est en parfait accord avec l'hypothèse formulée dans un autre travail⁴, à savoir que le taux moyen d'arginine-vasotocine augmente au fur et à mesure que la salinité du milieu ambiant augmente, c'est-à-dire que l'animal stocke progressivement dans son hypophyse des quantités croissantes d'arginine-vasotocine. Nous essaierons ultérieurement d'apporter des arguments expérimentaux en faveur de cette hypothèse.

Tableau I. Principales caractéristiques des Anguilles employées

| Anguilles ^a | Mer du Nord |
|-------------------------------|-------------|
| Nombre d'Anguilles utilisées | 46 |
| Poids moyen (g) | 372 ± 14,5 |
| Longueur moyenne (mm) | 546 ± 6,0 |
| Poids moyen des gonades (g) | 4,23 ± 0,32 |
| Rapport gonadosomatique moyen | 1,09 ± 0,04 |

^a Toutes les Anguilles utilisées sont des Anguilles argentées.

Tableau II. Concentrations hormonales (moyennes) mises en évidence aux niveaux de l'hypophyse et du noyau préoptique chez l'Anguille pêchée en Mer du Nord

| | |
|---|----------------------------------|
| Arginine-vasotocine hypophysaire: (m UI ± erreur-type) | 627,59 ± 34,71 |
| Intervalle de confiance de la moyenne | 697,71 - 557,48 (<i>P</i> 0,05) |
| Isotocine hypophysaire: (m UI ± erreur-type) | 166,67 ± 5,81 |
| Intervalle de confiance de la moyenne | 178,40 - 154,93 (<i>P</i> 0,05) |
| Arginine-vasotocine noyau préoptique: (m UI ± erreur-type) | 25,70 ± 0,76 |
| Intervalle de confiance de la moyenne | 27,24 - 24,17 (<i>P</i> 0,05) |
| Isotocine noyau préoptique: (m UI ± erreur-type) | 9,76 ± 0,42 |
| Intervalle de confiance de la moyenne | 10,60 - 8,92 (<i>P</i> 0,05) |

¹ F. C. HOLDER, C. r. Acad. Sci., Paris 266, Série D, 1607 (1968).

² F. C. HOLDER, Gen. comp. Endocr. 11, 235 (1968).

³ F. C. HOLDER, C. r. Acad. Sci., Paris 269, Série D, 1304 (1969).

⁴ F. C. HOLDER, C. r. Acad. Sci., Paris 269, Série D, 1441 (1969).

⁵ T. HIRANO, Endocr. jap. 11, 87 (1964).

⁶ T. HIRANO, Endocr. jap. 13, 59 (1966).

⁷ B. K. FOLLET et D. S. FARNER, Gen. comp. Endocr. 7, 111 (1966).

⁸ P. HOLTON, Br. J. Pharmac. 3, 328 (1948).

⁹ R. A. MUNSICK, Endocrinology 66, 451 (1960).

Tableau III. Test t de Student

| Comparaison effectuée* | t calculé | $t_{0,05}$ | $t_{0,01}$ |
|---|-------------|------------|------------|
| Arginine-vasotocine / Isotocine (hypophyse) | 13,09 | 2,02 | 2,70 |
| Arginine-vasotocine / Isotocine (noyau préoptique) | 18,36 | 2,02 | 2,70 |
| Arginine-vasotocine hypophysaire / Arginine-vasotocine noyau préoptique | 17,34 | 2,02 | 2,70 |
| Isotocine hypophysaire / Isotocine noyau préoptique | 26,95 | 2,02 | 2,70 |

* Les comparaisons sont effectuées à partir des moyennes de concentrations représentées en Tableau II.

En conclusion, la chromatographie en couche mince d'extraits hypophysaires et préoptiques d'Anguilles pêchées en Mer du Nord permet de mettre en évidence, et ce pour les deux territoires considérés, la présence de deux substances à effet oxytocique qui migrent de la même façon que l'arginine-vasotocine de synthèse et l'isotocine. Les dosages montrent qu'au niveau du noyau préoptique le taux moyen d'arginine-vasotocine est supérieur à celui de l'isotocine, fait que l'on retrouve également au niveau de l'hypophyse¹⁰.

Summary. Thin-layer chromatographic separation and bioassay of arginin-vasotocin and ichtyotocin of hypophyseal and preoptic nucleus extracts from North Sea eels show that the hypophysis is much richer in arginin-

vasotocin than in ichtyotocin. Analogous results have been observed in the preoptic nucleus fractions.

F. C. HOLDER¹¹

Groupe de Laboratoires de Strasbourg-Cronenbourg,
Laboratoire des Applications Biologiques,
23, rue du Loess, F-67 Strasbourg 3 (France),
21 Mai 1970.

¹⁰ Nous tenons à mercier ici M. le Professeur BARGMANN qui nous a facilité le travail à l'Institut d'Anatomie de Kiel, ainsi que son Assistant, le Docteur WELSCH, et les différents membres du personnel technique.

¹¹ Avec la collaboration technique de M. G. HOELTZEL.

Quantitative Untersuchung der Chelatbildung zwischen Rutin und Aluminium-III-chlorid

Die im UV-Bereich bei Zugabe von AlCl_3 auftretende bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima von Flavonen und Flavonolen, welche am Kohlenstoffatom C-3 oder C-5 freie Hydroxylgruppen tragen, stellt ein wichtiges Indiz für die Analytik der Flavonoide dar¹⁻³. Unter der Annahme einer Chelatbildung lässt sich die bathochrome Verschiebung zwanglos verstehen. Die Verschiebung der langwelligen Absorptionsbande wird besonders gross, wenn zusätzlich zu den Hydroxylgruppen am C-3 oder C-5 noch *orthoständige* Hydroxylgruppen am B-Ring vorhanden sind⁴.

R. K. MARKHAM und T. I. MABRY⁵ konnten zeigen, dass die angenommenen Chelate sich durch ihre Stabilität gegenüber Säuren unterscheiden lassen. Sie fanden, dass die Hydroxylgruppen an C-3 oder C-5 säurestabile Chelate bilden, während die *ortho*-ständigen Hydroxylgruppen am B-Ring dazu nicht in der Lage sind. Die Instabilität des Chelates am B-Ring äussert sich darin, dass das bislang nur durch die bathochrome Verschiebung nach-

gewiesene Chelat nach Säurezugabe unter hypsochromer Verschiebung der Absorptionsbande zerfällt.

Einen Strukturvorschlag dieser Chelate, der mit den vorher genannten experimentellen Befunden übereinstimmt, hat T. I. MABRY⁶ gemacht.

Wir konnten, wie im folgenden dargestellt wird, den Strukturvorschlag von T. I. MABRY⁶ durch eine quantitative Untersuchung der Chelatbildung absichern.

- L. HÖRHAMMER, R. HAENSEL und R. STRASSER, Arch. Pharmac. 285, 438 (1952).
- L. JURD, in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Ed. T. A. GEISSMAN; Pergamon Press, Oxford 1962), p. 107.
- L. JURD und T. A. GEISSMAN, J. org. Chem. 21, 395 (1956).
- L. JURD, Phytochemistry 8, 445 (1969).
- R. K. MARKHAM und T. I. MABRY, Phytochemistry 7, 1197 (1968).
- T. I. MABRY, in *Perspectives in Phytochemistry* (Academic Press, London, New York 1969), p. 1-44.

