



HAL
open science

Régulation différentielle de l'expression des gonadotropines (LH et FSH) chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*

Salima Aroua

► **To cite this version:**

Salima Aroua. Régulation différentielle de l'expression des gonadotropines (LH et FSH) chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*. Biologie de la reproduction. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: 2008PA066273 . tel-00811792

HAL Id: tel-00811792

<https://theses.hal.science/tel-00811792>

Submitted on 11 Apr 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physiologie de la Reproduction

Présentée par
Salima AROUA

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Régulation différentielle de l'expression des gonadotropines (LH
et FSH) chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla***

Soutenue le 9 juillet 2008

JURY

- | | |
|---|---------------------------|
| - Mme Le Gac Florence, DR INRA, Rennes | Rapporteur |
| - Mr Kah Olivier, DR CNRS, Univ. Rennes | Rapporteur |
| - Mr Boeuf Gilles, PR UPMC, Banyuls | Examineur |
| - Mr Counis Raymond, DR CNRS, Paris | Examineur |
| - Mr Elie Pierre, DR Cemagref, Bordeaux | Examineur |
| - Mme Dufour Sylvie, DR CNRS, MNHN | Directeur de thèse |

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je voudrais remercier les membres du jury, Madame Florence Le Gac et Monsieur Olivier Kah qui ont accepté « d'endosser les rôles de rapporteurs », ainsi qu'à Messieurs Gilles Boeuf, Pierre Elie et Raymond Counis qui m'ont fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Sylvie Dufour qui m'a formée, coachée, supportée, aidée et motivée au cours de toutes ces années passées au sein de son laboratoire. Ce fut un réel plaisir, j'y ai appris énormément sur le plan scientifique comme sur le plan humain.

Un grand merci également à l'ensemble de l'équipe qui m'a accueillie en son sein : à Nadine qui m'a formée à la culture cellulaire et qui dans les derniers mois a été un de mes nombreux coachs ; à Karine pour son aide et son soutien au cours des périodes de rédaction et en dehors ; à Bernadette et Sylvie pour les travaux d'histologie et les dosages hormonaux, pour bonne humeur quotidienne (ou presque) et pour les nombreuses discussions et fous rires partagés ; et à Marie-Emilie avec qui j'ai partagé le « bateau de la thèse ». Merci, merci, merci.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à Madame Monika Schmitz qui m'a initiée à la biologie moléculaire, il y a quelques années de cela et qui, tout au long de mon parcours, m'a procuré de judicieux conseils. J'espère pouvoir en profiter encore longtemps.

Merci également à Monsieur Finn-Arne Weltzien qui a su, avec douceur et sagesse, me faire pousser les portes de la PCR quantitative en temps réel... Et qui, par la suite, m'a si gentiment reçu au « pays des Vikings ».

Au cours de ces années, j'ai pu rencontrer une multitude de personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et m'enrichir tant d'un point de vue scientifique, que d'un point de vue humain. Donc merci à l'équipe des Céphalos : Laure, Aude, Sébastien, Yann, Sandra et tous les gens de passage pour ces petits-déjeuners studieux qui m'ont appris et m'apprennent encore, au fur et à mesure, à améliorer mes discours au public.

Merci aux copains thésards ou jeunes docteurs: Gersende, Cécile, Hélène (la « Cemagrefienne »), Anne-Gaëlle, Eric, Patrick (alias « speedy gonzalez »), Marie-Emilie, Jean-Baptiste, Stéphanie, Sandra et tous les autres qui, partageant les mêmes angoisses, épreuves, difficultés, mais aussi motivations et joies, m'ont permis d'avancer ; et aux « autres » docteurs : Catherine, Miskal, Marthe,... qui me montrent que tout est possible.

Merci à tous les habitants (ou ayant habité) du 7 rue Cuvier. Merci pour les pauses-café et les déjeuners dans la ménagerie, merci pour la bonne humeur quotidienne, merci pour le soutien ; bref, je suis vraiment heureuse d'être passée par là.

Merci aux amis et amies qui m'ont soutenue et motivée pendant tout ce temps, m'écoutant patiemment leur parler du cycle de vie de l'anguille, de mes travaux en cours ou encore de mes chers élèves ; ça n'a pas dû être facile, je vous félicite donc pour cela et vous remercie du fond du coeur....

Et bien sûr, un grand grand merci à ma famille. Mes sœurs, Saida, Karima et Lila, mes frère et beau-frère, Salim et Jean-Marc, mes parents Mohand et Chala, et les nouveaux arrivants Salma et Yanis qui m'ont porté et ont cru en moi tout au long de mon parcours.

Enfin, j'aimerais dédier ce travail à tous les miens et plus spécialement à mon grand père Abdellah Aroua qui m'a appris que la patience et la sagesse étaient les plus sains objectifs à atteindre.

Liste des publications et communications réalisées pendant la formation doctorale

Articles publiés:

Schmitz M, **Aroua S**, Vidal B, Le Belle N, Elie P, Dufour S, 2005. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81: 107-119.

Aroua S, Schmitz M, Baloché S, Vidal B, Rousseau K, Dufour S, 2005. Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 82: 221-232.

Sbaihi M, Kacem A, **Aroua S**, Baloché S, Rousseau K, Lopez E, Meunier F, Dufour S, 2007. Thyroid hormone-induced demineralisation of the vertebral skeleton of the eel, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol.* 151(1): 98-107.

Aroua S, Weltzien F-A, Le Belle N, Dufour S, 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids. *Gen Comp Endocrinol.* 153(1-3): 333-343.

Article en préparation:

Aroua S, Baloché S, Le Belle N, Rousseau N, Dufour S. Activin differentially regulates luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression by eel pituitary cells.

Chapitres de livre:

Rousseau K, **Aroua S**, Schmitz M, Elie P, Dufour S. Silvering: metamorphosis or puberty? In 'Migration and Reproduction of the European eel' (G. van den Thillart, S. Dufour, C. Rankin, eds), Springer Publisher (sous presse).

Aroua S, Rousseau K, Schmitz M, Chang CF, Dufour S. Positive and negative regulations of endogenous brain gonadoliberin and pituitary gonadotropins during eel artificial maturation. In 'Migration and Reproduction of the European eel' (G. van den Thillart, S. Dufour, C. Rankin, eds), Springer Publisher (sous presse).

Communication orale:

Aroua S, Schmitz M, Weltzien F-A, Baloché S, Le Belle N, Rousseau K, Dufour S, 2006. Differential expression of LHbeta and FSHbeta in European eel, *Anguilla anguilla*. Proceedings of the 23rd Conference of European Comparative Endocrinologists, Manchester, England. Abstract book p. 64, oral communication (O79).

Communications affichées:

Aroua S, Sbaihi M, Huang Y-S, Le Belle N, Dufour S, 2007. Synergistic action of androgens and cortisol on gonadotropin regulation in European eel, *Anguilla anguilla*. Proceedings of the 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish in Saint Malo, France. Abstract book p. 118, poster communication (P27).

Aroua S, Le Belle N, Schmitz M, Dufour S, 2007. In vitro regulation by activinB and IGFI of gonadotropin expression in European eel, *Anguilla anguilla*. Proceedings of the 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish in Saint Malo, France. Abstract book p. 119, poster communication (P28).

Principales abréviations

11-KT: 11-kétotestostérone

CA: catécholamine

DA: dopamine

DHP: 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregen-3-one

DHT : dihydrotestostérone

E₂ : oestradiol

EIA - ELISA: dosage immuno-enzymatique

F : Cortisol

FSH : hormone folliculo-stimulante (follicle-stimulating hormone)

FSH β : sous-unité β de la FSH

GH : hormone de croissance (growth hormone)

GnRH : gonadolibérine (gonadotropin-releasing hormone)

GP : hormone glycoprotéique

GP α : sous-unité α des hormones glycoprotéiques

hCG : gonadotropine chorionique humaine

IGF : facteur de croissance de type insuline (insulin-like growth factor)

IO : index oculaire

LH : hormone lutéinisante (luteinizing hormone)

LH β : sous-unité α de la LH

HPLC : chromatographie liquide haute pression

NA : noradrénaline

NPOav : noyau préoptique antéroventral

POA : aire préoptique

PRL : prolactine

qrt RT-PCR: PCR quantitative en temps réel

RIA: dosage radio-immunologique

RGS - GSI : rapport gonadosomatique (Poids des gonades / Poids total du corps)

RTDS – DSI : rapport tractus digestif-somatique (Poids du tractus digetif/ Poids total du corps)

T : testostérone

T3 : triiodothyronine

T4 : thyroxine

TSH : hormone thyroestimulante (thyroid-stimulating hormone)

TH : tyrosine hydroxylase

Vtg : vitellogénine

SOMMAIRE

Remerciements

Liste Des Publications

Abréviations

I. INTRODUCTION GENERALE	1
1. Présentation du modèle : l'anguille européenne	1
1.1. Cycle biologique de l'anguille	1
1.2. Maturation expérimentale	4
2. Les hormones gonadotropes	5
2.1. Structures	5
2.2. Mode d'action des hormones gonadotropes	8
3. Fonctions des gonadotropines	10
3.1. Chez le mâle	10
a. Mammifères	10
b. Téléostéens	11
3.2. Chez la femelle	13
a. Mammifères	13
b. Téléostéens	14
4. Contrôle de la production des gonadotropines	16
4.1. Contrôle cérébral	16
4.1.1. La gonadolibérine	16
4.1.1.1. Structure	17
4.1.1.2. Lieu de synthèse et action de la GnRH hypophysiotrope	18
a. Chez les mammifères	18
b. Chez les téléostéens	19
4.1.2. La dopamine	20
4.1.3. La kisspeptine	22
4.2. Contrôle périphérique	24
4.2.1. Rétrocontrôles stéroïdiens	24
4.2.2. Les peptides gonadiques	26
5. Objectifs de la thèse	29
II. MATERIEL ET METHODES	31
1. Animaux et expérimentations <i>in vivo</i> (Articles 1, 2, 3)	31
1.1. Provenance des animaux	31
1.2. Etude de terrain	31
1.3. Traitements hormonaux	31
1.3.1. Traitements par les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes (Articles 1, 2, 3)	31
1.3.2. Traitements gonadotropes (Article 1)	32
2. Prélèvements	32
2.1. Sang	32
2.2. Hypophyse	33
2.2.1. Pour dosages radioimmunologiques des hormones (RIA)	33
2.2.2. Pour dosages des ARNm (dot blot et PCR quantitative)	33
2.2.3. Pour marquage par hybridation <i>in situ</i> des cellules gonadotropes (Article 1)	33
2.3. Gonades et tractus digestif	33
2.3.1. Pour le calcul des rapports gonado-somatique et tractus digestif-somatique	33
2.3.2. Pour étude histologique (Article 2)	34
3. Expérimentations <i>in vitro</i> (Articles 3, 4 et données complémentaires)	34
3.1. Provenance des animaux	34
3.2. Culture primaire de cellules hypophysaires et traitements hormonaux	34
3.3. Traitements des cellules	35

3.3.1. Traitements stéroïdiens (Articles 3 et données complémentaires)	35
3.3.2. Traitements par les peptides gonadiques (Article 4)	35
3.3.3. Traitements par les hormones métaboliques (données complémentaires)	35
3.3.4. Lyse cellulaire (Articles 3, 4 et données complémentaires)	36
4. Clonage de la sous-unité FSHβ chez l'anguille européenne (Article 1)	36
4.1. Séquence partielle de l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité FSH β	36
4.2. Séquence complète de l'ADNc codant pour la sous-unité FSH β	36
5. Histologie et hybridation <i>in situ</i>	37
5.1. Coupes de gonades (Article 2)	37
5.2. Localisation par hybridation <i>in situ</i> des cellules gonadotropes (Article 1)	37
6. Dosages	38
6.1. Dosages des ARN messagers des hormones hypophysaires	38
6.1.1. Extraction des ARNs totaux	38
6.1.2. Dosages de l'expression des hormones hypophysaires par dot blot (Articles 1 et 2)	38
6.1.3. Dosage de l'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (Articles 3, 4, données complémentaires)	39
6.2. Dosages immunologiques	40
6.2.1. Dosages radioimmunologiques des hormones hypophysaires et des hormones thyroïdiennes (Article 2)	40
6.2.2. Dosages immunoenzymatiques des hormones stéroïdes et de la vitellogénine (ELISA, EIA) (Article 2)	40
III. RESULTATS	41
1. Article 1 : « Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroids feedback in the European eel ».	41
1.1. Résumé des résultats	41
1.1.1. Clonage de la FSH	41
1.1.2. Localisation hypophysaire des cellules à LH et à FSH	42
1.1.3. Variations de l'expression des sous-unités des gonadotropines au cours de la maturation expérimentale	42
a. Chez la femelle	42
b. Chez le mâle (données complémentaires)	43
1.1.4. Effets de traitements <i>in vivo</i> par les stéroïdes sexuels sur l'expression des gonadotropines	43
1.2. Texte de l'article 1	45
2. Article 2 : « Endocrine evidence that silvering a secondary metamorphosis in the eel is a pubertal rather than a metamorphic event ».	59
2.1. Résumé des résultats	59
2.1.1. Echantillonnage 1	59
2.1.2. Echantillonnage 2	60
2.1.3. Echantillonnage 3	60
2.1.4. Expérimentation <i>in vivo</i>	61
2.2. Texte de l'article 2	63
3. Article 3 : « Development of real time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> effects of sex steroids ».	75
3.1. Résumé des résultats	75
3.1.1. Effets des stéroïdes <i>in vivo</i> sur l'expression des sous-unités des gonadotropines	75
3.1.2. Effets des stéroïdes <i>in vitro</i> sur l'expression des sous-unités des gonadotropines	75
3.2. Texte de l'article 3	77
4. Article 4 : «Activin differentially regulates luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression by eel pituitary cells». Aroua S et al	88
4.1. Résumé des résultats	88
4.1.1. Distribution de la sous-unité β B de l'activine chez l'anguille	88
4.1.2. Effets de l'activine B sur l'expression des sous-unités des gonadotropines	88

4.1.3. Interactions de la follistatine et de l'activine sur l'expression de la FSH β	89
4.1.4. Interactions de la testostérone et de l'activine sur l'expression de la LH β	89
4.2. Texte de l'article	90
5. Etudes complémentaires : Effets d'hormones métaboliques sur l'expression des gonadotropines	122
5.1. Effets de l'IGF-1 sur l'expression des sous-unités des gonadotropines	122
5.2. Effets de la leptine sur l'expression des sous-unités des gonadotropines	123
5.3. Effets du cortisol et des combinaisons cortisol – stéroïdes sexuels sur l'expression des sous-unités des gonadotropines	123
 IV DISCUSSION GENERALE	 128
1. Développement de nouveaux outils pour l'étude des gonadotropines chez l'anguille européenne	128
1.1. Clonage de la sous-unité FSH β et dualité des gonadotropines.	128
1.2. Sites d'expression hypophysaires des hormones gonadotropes.	131
1.3. Mesure des taux d'expression des hormones gonadotropes.	134
2. Activation de l'axe gonadotrope et expression différentielle des hormones gonadotropes au cours de l'argenture : arguments en faveur d'un évènement pubertaire plutôt que métamorphique (article de revue 5)	136
2.1. Résumé de l'article	136
2.2. Texte de l'article de revue 5 : « Silvering: metamorphosis or puberty ? »	138
3. Expression différentielle des hormones gonadotropes au cours de la maturation sexuelle expérimentale et rôles des stéroïdes sexuels (article de revue 6)	163
3.1. Résumé de l'article	163
3.2. Texte de l'article de revue 6 : « Positive and negative regulations of endogenous brain gonadoliberins and pituitary gonadotropins during eel artificial maturation. »	165
4. Rôle de l'activine dans la régulation différentielle des gonadotropines	191
5. Rôles de facteurs métaboliques dans la régulation différentielle des gonadotropines	193
5.1. Rôle d'un facteur de croissance : l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	193
5.2. Rôle de la leptine	195
5.3. Rôle du cortisol	198
 V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	 201
1. Expression différentielle des hormones gonadotropes au cours du cycle	201
2. Les facteurs périphériques candidats à l'activation de l'axe gonadotrope à la puberté	202
2.1. Les facteurs gonadiques	202
2.2. Les facteurs métaboliques	203
3. Scénario possible de l'activation de l'axe gonadotrope à l'argenture	205
 VI. REFERENCES	 209

I. INTRODUCTION GENERALE

1. Présentation du modèle : l'anguille européenne

1.1. Cycle biologique de l'anguille

L'anguille appartient au super-ordre des Elopomorphes, lui-même étant compris dans le taxon des Téléostéens (Figure 1). Les Elopomorphes présentent un développement indirect avec un stade larvaire particulier : la larve leptocéphale.

Chez l'anguille européenne, les larves leptocéphales nées dans la région de la mer des Sargasses (Schmidt, 1922 ; Wang and Tzeng, 2000) traversent l'Atlantique, portées par les courants. Au cours de cette traversée, dont la durée varie selon les auteurs de 6 à 9 mois pour les estimations les plus courtes (Lecomte-Finiger, 1992 ; Arai et al, 2000) jusqu'à plusieurs années pour les plus longues (2-3 ans pour Schmidt, 1922 ; 2-7 ans pour Van Utrecht et Holleboom, 1985), les larves vont croître et accumuler des réserves. Arrivées au niveau du plateau continental, les larves leptocéphales reconnaissables par leur aspect caractéristique en « feuille de saule » se transforment et deviennent des civelles, c'est la métamorphose larvaire (Schmidt, 1909) (Figure 2). En plus des spectaculaires changements morphologiques, cette métamorphose s'accompagne également d'importants changements physiologiques et comportementaux (pour revue : Otake, 2003). Les civelles qui ont maintenant une apparence proche de celle de l'adulte vont petit à petit se pigmenter et seront alors appelées anguillettes (Elie et al, 1982). Elles vont également acquérir un réel comportement de migration et coloniser les eaux continentales où va débiter une longue phase de croissance.

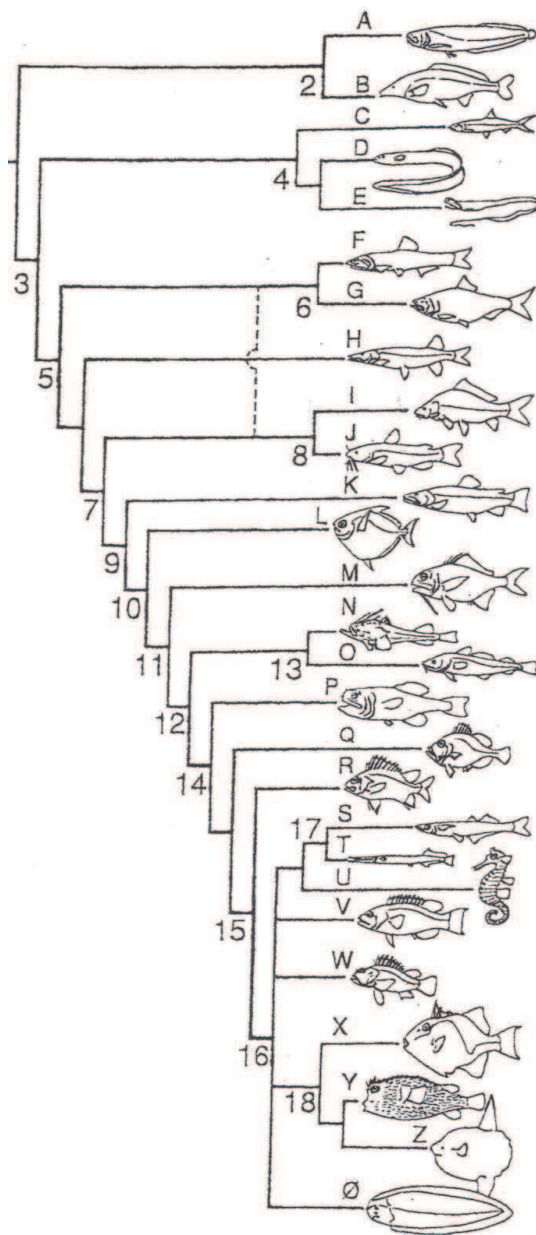


Figure 1: Phylogénie des téléostéens. 1: téléostéens; Sous-Ordres: 2: Ostéoglossomorphes; 3: Elopocéphales; 4: Elopomorphes; 5: Clupeocephales; 6: Clupeomorphes; 7: Eutélostéens; 8: Ostariophysii; 9: Neognathes; 10: Acanthomorphes; 11: Euacanthomorphes; 12: Holacanthoptérygiens; 13: Paracanthoptérygiens; 14: Acanthoptérygiens; 15: Euacanthoptérygiens; 16: Percomorphes; 17: Atherinomorphes; 18: Tétrodontiformes; Familles: A: Osteoglossidae; B: Mormyridae; C: Elopidae; D: Anguillidae; E: Saccopharyngidae; F: Engraulidae; G: Clupidae; H: Esocidae; I: Cypriniformes; J: Siluriformes; K: Salmoniformes; L: Lampridiformes; M: Polymyxiiiformes; N: Lophiiformes; O: Gadiformes; P: Stephanoberyciformes; Q: Zéiformes; R: Beryciformes; S: Atherinidae; T: Béloniformes; U: Gastérostéiformes; V: Perciformes; W: Scorpeniformes; Balistidae; Y: Diodontidae; Z: Molidae; Ø: Pleuronectiformes

A ce stade, les anguilles appelés « anguilles jaunes » vont essentiellement croître et accumuler les réserves énergétiques nécessaires à la maturation sexuelle future et à la migration de reproduction (Van Ginneken and Van den Thillart, 2000 ; Van den Thillart et al, 2004 ; Van Ginneken et al, 2005). C'est également au cours de ce stade qu'intervient la différenciation sexuelle (Colombo et al, 1984 ; Beullens et al, 1997) mais le développement des gonades ne se produira que bien plus tard, au moment de la migration de reproduction. Après une période plus ou moins longue (de quelques années à plus de 20 ans) en fonction des latitudes, des écosystèmes et du sexe des individus (Bertin, 1951 ; Vollestad, 1992 ; Melia et al, 2006), les anguilles jaunes vont réaliser une « seconde métamorphose » appelée argenture (Figure 2). L'argenture consiste en un ensemble de transformations morphologiques (par exemple, la livrée prenant une coloration argentée caractéristique des poissons pélagiques), physiologiques (par exemple, le développement des cellules à chlorure dans les branchies préparant les animaux au passage en eau de mer) et comportementaux (passage d'un mode de vie sédentaire à un comportement de migration et début de leur phase de jeûne) (Lecomte-Finiger, 1990 ; Fontaine, 1994 ; Durif et al, 2005). Ces modifications, qui préadaptent les anguilles à une vie océanique, marquent le début de la migration de reproduction (Figure 2).

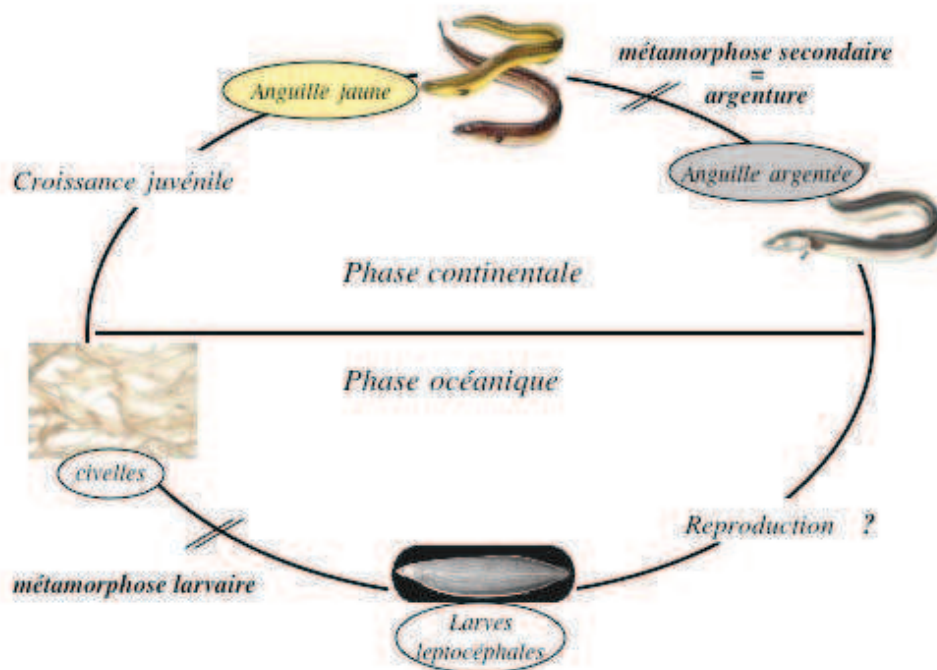


Figure 2: Cycle biologique de l'anguille.

Les anguilles argentées quittent alors les cours d'eau et retournent vers leur lieu de ponte océanique. Cette partie du cycle est aujourd'hui encore inconnue. La migration se faisant probablement à grande profondeur, aucun individu argenté n'a pu être capturé ou suivi au-delà du talus continental. Or, c'est au cours de la migration océanique et en présence de facteurs environnementaux particuliers (pression : Sébert et al, 2007 ; activité motrice : Van Ginneken et al, 2007, ...) que va se produire la maturation sexuelle.

1.2. Maturation expérimentale

Actuellement, toutes les informations concernant cette période de la vie de l'anguille proviennent d'expérimentations. En effet, les anguilles argentées dont la migration a été empêchée restent bloquées à un stade prépubère (Dufour et al, 2003). Les expérimentateurs ont donc très tôt essayé d'accéder aux stades ultérieurs de développement et d'induire la maturation sexuelle à l'aide de traitements hormonaux.

Les premiers travaux rendant compte d'une stimulation de la gamétogenèse chez l'anguille se sont déroulés dans notre laboratoire au Muséum National d'Histoire Naturelle : après des injections d'extrait d'urine de femme enceinte à des anguilles mâles, Fontaine (1936) observe une stimulation de la spermatogenèse complète et l'émission des gamètes. Chez la femelle, la première maturation gonadique a été obtenue par le même groupe et induite par des injections d'extraits hypophysaires de carpe (Fontaine et al, 1964).

Ces travaux précurseurs vont être la base de toutes les expérimentations visant à induire le développement gonadique chez les différentes espèces d'anguilles (*A. anguilla*, *A. japonica*, *A. rostrata*, *A. australis*, *A. dieffenbachi*) (pour revue : Dufour et al, 2003). Depuis, ces techniques ont été utilisées et ont permis l'obtention des premières larves chez l'anguille japonaise (Yamamoto et Yamauchi, 1974 ; Yamauchi et al, 1976) ; des larves qui, aujourd'hui, peuvent être maintenues jusqu'à 200 jours en aquarium et qui réalisent leur 1^{ère} métamorphose (Pour revue : Tanaka, 2003). Cependant, les taux de réussite de la reproduction sont très faibles et l'ensemble des étapes est encore mal maîtrisé.

Les expériences de maturation ont également permis de démontrer que l'arrêt du développement gonadique au stade argenté chez les anguilles dont on a empêché la migration, n'était pas le résultat d'un manque de sensibilité des gonades. Des travaux ultérieurs réalisés par l'équipe ont montré par des techniques de dosage RIA que le blocage au stade argenté était dû à un déficit en hormones gonadotropes endogènes (Dufour et al, 1983b).

2. Les hormones gonadotropes

La reproduction, phénomène universel qui assure la pérennité des espèces en transmettant l'information génétique d'une génération à l'autre, est le résultat chez les vertébrés d'une cascade d'évènements contrôlée par un axe neuroendocrinien appelé l'axe gonadotrope. L'axe gonadotrope des vertébrés met en jeu trois organes principaux : le cerveau qui joue le rôle de « chef d'orchestre » en compilant les informations provenant de l'environnement (température, luminosité...) et celles provenant de l'organisme (accumulation suffisante des réserves...); les gonades qui sont le lieu de fabrication des gamètes, et l'hypophyse qui a un rôle de charnière entre les deux précédents organes.

Au niveau hypophysaire, deux hormones vont avoir la charge de transmettre l'information cérébrale et contrôler le développement gonadique : ce sont les hormones gonadotropes hypophysaires ou gonadotropines.

2.1. Structures

Les hormones gonadotropes hypophysaires, l'hormone lutéinisante (LH= Luteinizing Hormone) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH= Follicle Stimulating Hormone) appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques dans laquelle on retrouve également les gonadotropines chorioniques (CG) et la thyrotropine (TSH= Thyroid Stimulating Hormone). Chez les vertébrés, les gonadotropines sont des protéines hétérodimériques (Papkoff et Samy, 1967) richement glycosylées, constituées de deux sous-unités :

- La sous-unité α : elle est commune aux différentes hormones glycoprotéiques pour une même espèce.
- La sous-unité β : elle est spécifique de chacune des hormones glycoprotéiques et c'est elle qui confère aux hormones leur spécificité d'action.

Les deux sous-unités, dont les repliements sont maintenus par des ponts disulfures, sont associées l'une à l'autre par des liaisons non covalentes. De plus, la cristallographie de la CG humaine a permis de mettre en évidence une sorte de « ceinture de sécurité » formée par la partie C terminale de la sous-unité β qui enserre la sous-unité α (Laphorn et al, 1994). La

molécule ainsi formée va être capable d'interagir spécifiquement avec son récepteur (Combarous et al, 1997).

Chez les poissons, la mise en évidence des gonadotropines et de leur structure a été plus tardive. Après quelques tentatives de purification chez le saumon (Otsuka, 1956) et le gardon (Breton, 1968), la première hormone gonadotrope purifiée a été obtenue chez la carpe par Burzawa-Gerard (1971). Cette hormone est capable de stimuler chez le mâle, la spermatogenèse et la spermiation et chez la femelle, l'ovogenèse et l'ovulation (pour revue : Fontaine, 1980).

Des travaux s'intéressant à la structure biochimique de cette hormone gonadotrope de carpe (cGTH) ont été réalisés et ont permis de mettre en évidence deux sous-unités, SU I et SU II (Burzawa-Gerard, 1974) dont les séquences partielles en acides aminés ont été déterminées (Jolles et al, 1977). La comparaison de ces sous-unités avec celles obtenues pour les gonadotropines mammaliennes montre de fortes identités de séquence entre la sous-unité SU I de la cGTH et les sous-unités α mammaliennes d'une part et entre la sous-unité SU II de la cGTH et les LH β mammaliennes d'autre part (Jolles et al, 1977). Par la suite, des études immunologiques réalisées à l'aide d'immunosérums dirigés contre l'hormone entière (cGTH) ou ses sous-unités (SU I=cGTH α ou SU II=cGTH β) ont permis la mise en évidence de ressemblances antigéniques entre la cGTH α et les sous-unités α bovine et ovine ainsi qu'entre la cGTH β et la LH β bovine (Burzawa-Gerard et al, 1980) ; de plus, davantage de ressemblances antigéniques étaient trouvées entre la cGTH β et la LH β qu'avec la FSH β suggérant que la cGTH était une hormone de type LH. Enfin, la réalisation de protéine hybride active associant une sous-unité α mammalienne à une GTH β de carpe a conforté l'idée de parenté entre les sous-unités des hormones gonadotropes de poissons et de mammifères (Marchelidon et al, 1979). La GTH de téléostéen étant capable d'induire l'ensemble du développement gonadique, il a alors été supposé que chez les téléostéens, seule une hormone gonadotrope existait (pour revue : Fontaine, 1980).

L'idée d'une hormone gonadotrope unique chez les poissons a été bousculée avec la mise en évidence d'une seconde gonadotropine chez le saumon (Suzuki et al, 1988a). Par la suite, la présence de deux gonadotropines a été démontrée chez un nombre croissant d'espèces et, comme suggérés par les travaux de Quérat et ses collègues, la dualité des gonadotropines semble être un caractère établi chez les gnathostomes (Quérat et al, 2001). Le

clonage et la comparaison des séquences confirment la parenté entre les LH mammaliennes et de téléostéens ainsi qu'entre les FSH mammaliennes et de téléostéens (Figure 3). Cependant, chez les téléostéens, les données concernant la FSH sont encore relativement peu nombreuses.

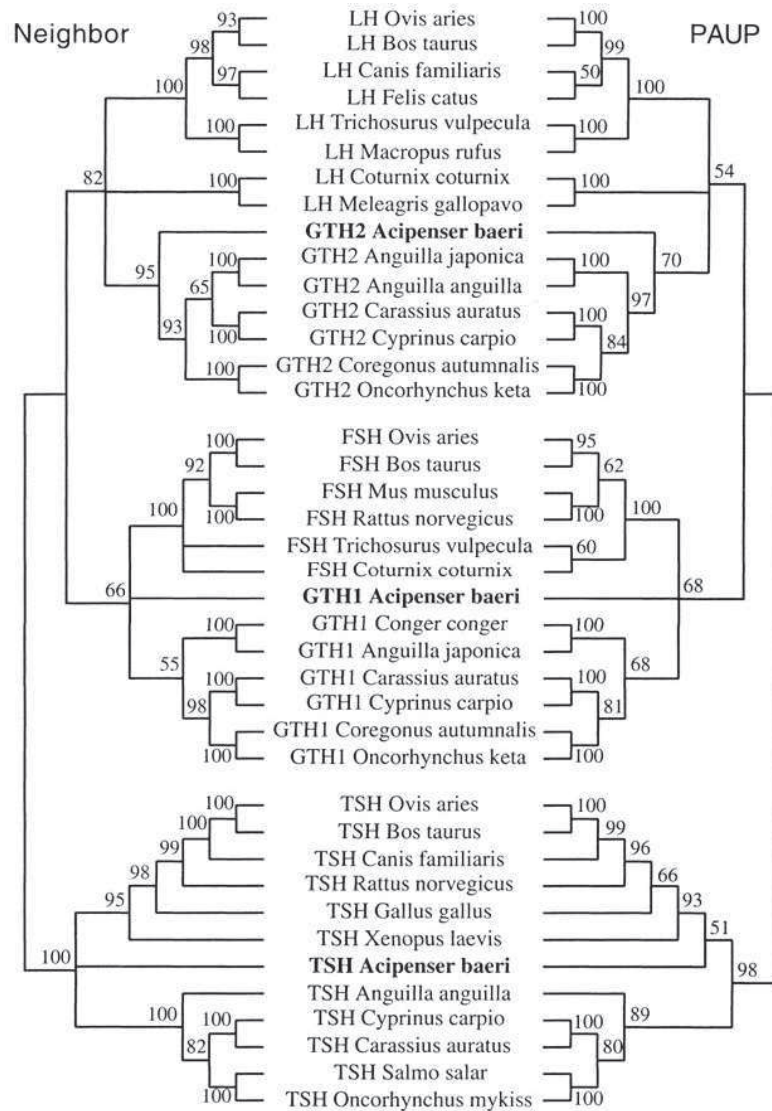


Figure 3 : Arbre phylogénétique des sous-unités β des glycoprotéines. Arbre réalisé à partir des séquences nucléotidiques selon les méthodes Neighbor-Joining (Neighbor) et de parcimonie maximale (PAUP) (Quérat et al, 2000).

Chez l'anguille européenne, les ADNc codant pour les sous-unités α (Quérat et al, 1990a), LH β (Quérat et al, 1990b) et TSH β (Salmon et al, 1993) des hormones glycoprotéiques avaient déjà été clonées. Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à la caractérisation de la sous-unité FSH β (article 1).

2.2. Mode d'action des hormones gonadotropes

Les hormones gonadotropes vont agir au niveau de tissus cibles via des récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs sont constitués de 3 parties distinctes (pour revue : Vassart et al, 2004):

- Une région N-terminale riche en leucine constituant le domaine extracellulaire. Celui-ci est responsable de la spécificité et de la haute affinité de liaison à l'hormone.
- Une région responsable de l'ancrage de la protéine dans la membrane, mais également impliquée dans la liaison du ligand et dans les mécanismes de transmission du signal. Cette région comprend 7 domaines transmembranaires, 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires.
- Une région C-terminale intracellulaire couplée à la protéine G et impliquée dans la transduction du signal.

Chez les mammifères, de nombreux travaux se sont intéressés à la spécificité du complexe hormone – récepteur. En effet, chacune des hormones glycoprotéiques va agir au niveau de « ses cellules cibles » via un récepteur spécifique : les récepteurs à FSH (FSH-R), à TSH (TSH-R) et à LH/CG (LH-R). Lors de la formation du complexe hormone – récepteur, les deux sous unités des gonadotropines vont avoir un rôle à jouer : la sous unité α de l'hétérodimère interagit le plus largement avec le récepteur, mais c'est la sous-unité β qui « autorise » ou non la liaison au récepteur (Pour revue : Combarous et al, 1997). La modification de conformation entraînée par la liaison de l'hormone à son récepteur permettra alors l'activation d'une des sous-unités de la protéine G associée. Ainsi commence la transduction intracellulaire du signal qui se termine par l'expression de gènes spécifiques (enzymes de la stéroïdogénèse, facteurs de croissance...).

Chez les téléostéens, les premiers travaux s'intéressant aux modes d'action de « l'hormone gonadotrope » au niveau gonadique ont été réalisés dans les années 80 et ont mis en évidence des sites de liaison spécifique à l'hormone sur des préparations membranaires (saumon : Salmon et al, 1984 ; Schultz et al, 1985 ; truite : Breton et al, 1986 ; anguille : Salmon et al, 1987). Par la suite, la mise en évidence des deux gonadotropines et leur purification ont permis avec des techniques similaires de démontrer dans l'ovaire du saumon coho, l'existence de deux récepteurs (Yan et al, 1992) montrant une moins grande spécificité

de liaison que chez les mammifères : le récepteur de type I est capable d'interagir avec la GTH I (FSH) mais aussi, avec une moindre affinité, la GTH II (LH) ; le récepteur de type II est, lui, très spécifique et n'interagit qu'avec la GTH II (LH).

Le développement des techniques de biologie moléculaire ont ensuite permis le clonage des récepteurs, d'abord chez le saumon amago (Oba et al, 1999a et b) puis chez de nombreux autres téléostéens : poisson-chat (Bogerd et al, 2001 ; Kumar et al, 2001a, b ; Vischer et Bogerd, 2003), poisson zèbre (Laan et al, 2002 ; Kwok et al, 2005), saumon (Maugars et Schmitz, 2006), anguille (Jeng et al, 2007), bar (Rocha et al, 2007), truite (Sambroni et al, 2007), flétan (Kobayashi et Andersen, 2008). L'analyse et la comparaison des séquences des récepteurs aux gonadotropines chez les poissons et les mammifères montrent qu'ils sont homologues (Oba et al, 2001) (Figure 4).

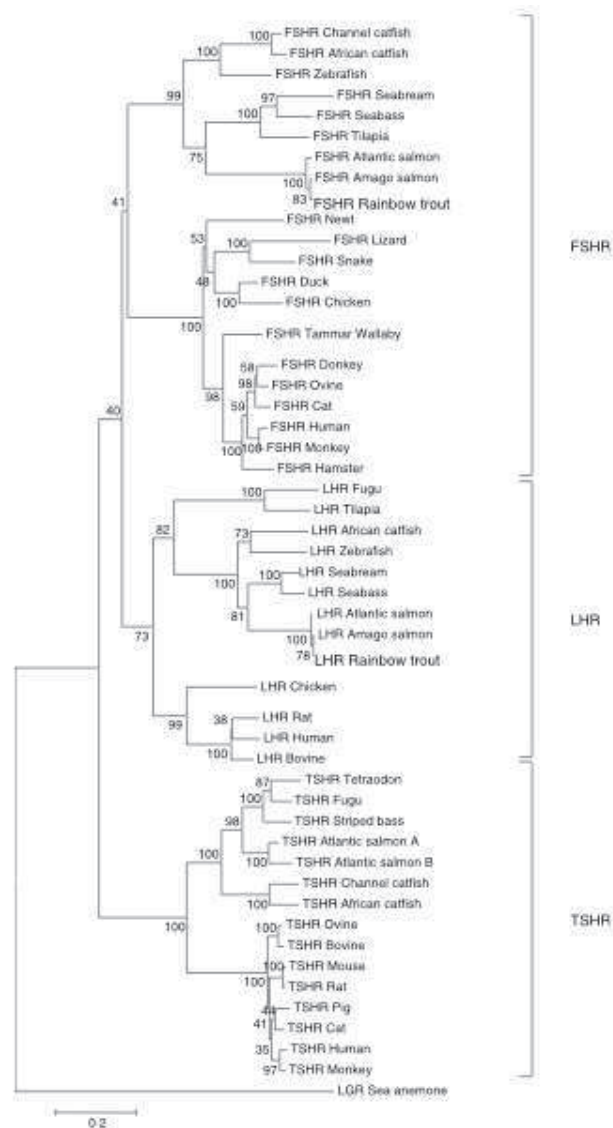


Figure 4 : Arbre phylogénétique des récepteurs des glycoprotéines. Arbre réalisé à partir des séquences en acides aminés (Sambroni et al, 2007).

La spécificité des récepteurs a été testée chez différentes espèces en étudiant la liaison des gonadotropines recombinantes (LH et FSH) avec les récepteurs recombinants homologues (LH-R et FSH-R) exprimés dans des lignées cellulaires. Chez le poisson-chat (Vischer et al, 2003) et le poisson zèbre (So et al, 2005), les résultats montrent que FSH-R est capable d'interagir avec la FSH mais également avec la LH, alors que LH-R est très spécifique et ne répond qu'à une stimulation par la LH. Chez la truite (Sambroni et al, 2007), les récepteurs montrent une plus grande spécificité, FSH-R ne répondant qu'à la FSH et LH-R qu'à la LH.

En ce qui concerne l'anguille, les deux récepteurs aux hormones gonadotropes ont été clonés partiellement chez l'anguille japonaise (Jeng et al, 2007). Leurs séquences ont été comparées à celles obtenues chez différents téléostéens et mammifères ; les résultats montrent que l'un appartient au groupe des FSH-R et l'autre au groupe des LH-R (Jeng et al, 2007). Le clonage complet des récepteurs et l'obtention de récepteurs recombinants permettrait d'étudier leurs spécificités de liaison.

3. Fonctions des gonadotropines

Les hormones gonadotropes hypophysaires ont pour site d'action les gonades. Organes situés dans la cavité abdominale, les gonades ont deux rôles majeurs: la synthèse et la maturation des gamètes (spermatogénèse ou ovogénèse) et la synthèse de facteurs de croissance et de stéroïdes sexuels (stéroïdogénèse). L'ensemble de ces événements est regroupé sous le nom de maturation gonadique et est sous le contrôle majeur des deux hormones gonadotropes hypophysaires, LH et FSH.

3.1. Chez le mâle

a. Mammifères

Chez le mâle, il existe une compartimentation de la gonade avec un « site » de fabrication des gamètes, les tubes séminifères et un « site » responsable de la sécrétion des hormones mâles, la glande interstitielle.

Dans les tubes séminifères, les cellules germinales sont étroitement associées aux cellules de Sertoli, grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère. Celles-ci vont avoir plusieurs rôles : un rôle protecteur envers les cellules

germinales et un rôle de « nettoyage » en phagocytant les cellules dégénérescentes. Elles vont également intervenir dans la maturation et la migration des gamètes. L'ensemble de ces actions de la cellule de Sertoli sont sous le contrôle d'une des deux hormones gonadotropes, la FSH. En effet, la cellule de Sertoli exprime à sa surface des récepteurs à la FSH et différentes études ont permis de mettre en évidence le rôle clé de cette hormone dans le « démarrage » de la spermatogénèse à la puberté (pour revue : McLachlan, 2000) et dans le maintien de la qualité de celle-ci au cours de la vie adulte (pour revue : McLachlan, 2000 ; Dadoune et Demoulin, 2001). De plus, la cellule de Sertoli est capable de synthétiser un ensemble de facteurs entrant en jeu dans la communication intra-testiculaire tels que l'inhibine ou l'activine (pour revue : de Kretser et al, 2004), et a également un rôle stéroïdogène étant capable de transformer la testostérone en oestradiol grâce à une aromatasase.

Dans la glande interstitielle, c'est-à-dire les tissus localisés entre les tubes séminifères, on trouve les cellules stéroïdogènes nommées cellules de Leydig. Celles-ci sont principalement sous le contrôle de la LH et sont capables de synthétiser la testostérone à partir de cholestérol. Elles vont également synthétiser un ensemble d'autres facteurs ayant des rôles aussi bien autocrine, comme l'IGF-I (Insulin-like growth factor 1), que paracrine comme l'ocytocine ou la vasopressine.

La maturation gonadique est donc le résultat d'un contrôle hypophysaire par les hormones gonadotropes et d'une communication étroite entre cellule de Leydig – cellule de Sertoli – cellules germinales dans le testicule.

b. Téléostéens

Chez les téléostéens, le testicule peut avoir deux structures différentes. Une structure dite lobulaire est la plus répandue : les cellules germinales sont disposées tout le long des tubes séminifères (Legendre et Jalabert, 1988). Une structure dite tubulaire peut être rencontrée chez certaines espèces : les cellules germinales sont exclusivement retrouvées dans l'extrémité aveugle des tubes séminifères.

Comme chez les mammifères, le testicule des téléostéens est compartimenté avec un « site » de fabrication des gamètes (tubes séminifères) et un « site » responsable de la sécrétion des hormones mâles (glande interstitielle). Dans les tubes séminifères, on retrouve des cellules de Sertoli et des cellules germinales qui, chez les téléostéens, se développent à l'intérieur de cystes (Weltzien et al, 2004). Dans ces cystes, les cellules germinales vont

proliférer et se développer de manière synchrone sous le contrôle de différents facteurs jusqu'à l'obtention des spermatozoïdes. Comme chez les mammifères, les cellules de Sertoli sont étroitement liées aux cellules germinales et sont soumises à des régulations par la FSH. En effet, les cellules de Sertoli possèdent à leur surface des FSH-R (Miwa et al, 1994, Oba et al, 2001). La FSH est impliquée dans la prolifération mais également dans l'activation des cellules de Sertoli et induit la synthèse d'un ensemble de facteurs (Nagahama, 2000).

Entre les tubes séminifères se trouvent les cellules de Leydig qui sont le lieu de production des androgènes. Cette production, impliquée à la fois dans la gamétogenèse et dans le développement des caractères sexuels secondaires (Borg, 1994) semble, comme chez les mammifères, être sous le contrôle de la LH (Miwa et al, 1994, Oba et al, 2001). En plus de la testostérone (T), la cellule de Leydig va synthétiser un stéroïde spécifique des téléostéens, la 11-kétotestostérone (11-KT).

Les travaux précurseurs de Miura et ses collaborateurs (1991) chez l'anguille japonaise ont permis de mettre en évidence le rôle joué par la 11-KT au cours de la spermatogenèse. En effet, les seules cellules germinales présentes dans le testicule d'anguille mâle maintenue en captivité sont les spermatogonies. Une seule injection de hCG chez ces mâles est capable d'induire une spermatogenèse complète, c'est-à-dire comprenant tous les stades de la spermatogonie au spermatozoïde (Miura et al, 1991a) et de manière concomitante une élévation des taux plasmatiques de 11-KT. Pour tester l'hypothèse d'une action possible de la 11-KT dans la spermatogenèse, les auteurs ont mis au point une technique de culture in vitro de fragments testiculaires, et ils observent, lorsque les fragments sont cultivés dans un milieu contenant de la 11-KT, une spermatogenèse complète (Miura et al, 1991b). Ces effets de la 11-KT sur la spermatogenèse ne sont néanmoins pas retrouvés chez tous les poissons. Chez la truite arc-en-ciel, la 11-KT semble n'induire aucun effet sur les spermatogonies de fragments testiculaires en culture (Loir, 1999).

Chez les téléostéens, comme chez les mammifères, la spermatogenèse résulte d'un « dialogue » étroit entre les différents compartiments du testicule contrôlé par les hormones gonadotropes hypophysaires.

3.2. Chez la femelle

a. Mammifères

Chez la femelle, la gonade est constituée d'une médulla centrale innervée et vascularisée et d'un cortex périphérique où sont stockés et où vont se développer les follicules. Le fonctionnement de l'ovaire s'organise autour des follicules comprenant une cellule germinale entourée de cellules folliculaires. Chez les mammifères, un stock de follicules est réalisé pendant la vie fœtale, ceux-ci vont rester quiescents jusqu'à l'entrée en puberté où le développement folliculaire, aussi appelé folliculogénèse va commencer (pour revue : Driancourt et al, 2001). Cette folliculogénèse se déroule en plusieurs étapes qui connaissent différents contrôles.

La folliculogénèse peut se décomposer en 2 phases (pour revue : Driancourt et al, 2001 ; Mermillod, 2001):

- La première phase correspond à la sortie d'un certain nombre de follicules de la réserve et à leur développement précoce. Durant cette phase, les follicules vont croître par augmentation du diamètre ovocytaire et par multiplication des cellules folliculaires formant la granulosa. Puis, le follicule va atteindre un état supérieur d'organisation avec la mise en place en périphérie de deux couches cellulaires constituant les thèques interne et externe. Cette phase semble se réaliser sans l'intervention des gonadotropines. En effet, chez la ratte ou la brebis hypophysectomisée, on observe dans les gonades, des follicules évoluant jusqu'au stade préantral.
- La seconde phase correspond au développement folliculaire terminal. Il coïncide chez la femme avec la phase folliculaire du cycle et est fortement dépendant des gonadotropines. Au cours de cette phase, deux événements ont lieu :

1) Le recrutement : Les follicules ayant atteint une taille suffisante et étant capable de répondre à la FSH vont poursuivre leur développement et évoluer de façon synchrone, les autres vont régresser et entrer en atrophie.

2) La sélection : Cette étape intervient au milieu de la phase folliculaire au moment où les taux circulants de FSH commencent à baisser. Les ou les follicules dominants sont sélectionnés et vont poursuivre leurs développements jusqu'à l'ovulation.

Au cours du développement folliculaire terminal, les gonadotropines interviennent à différents niveaux. La FSH va exercer son action au niveau des cellules de la granulosa via son récepteur et induire la synthèse de peptides (activine, inhibine et follistatine, protéines de liaison aux IGFs) et l'activité aromatasase. Après la sélection, la FSH stimule en plus l'expression des récepteurs de la LH dans les cellules de la granulosa (Figure 5).

La LH, elle, exerce son action sur les cellules de la thèque, y favorisant la synthèse des androgènes. En fin de phase folliculaire, lors de la réponse à la décharge ovulante, elle intervient sur les cellules de la granulosa et permet la maturation ovocytaire (Figure 5).

Les gonadotropines ont donc un rôle clé dans le contrôle de la maturation du follicule chez les mammifères. Néanmoins, des facteurs locaux vont également intervenir au cours de la folliculogénèse et agir en collaboration avec les gonadotropines (Pour revue : Driancourt et al, 2001 ; Mermillod, 2001 ; Webb et al, 2004).

b. Téléostéens

Chez les téléostéens, les ovaires sont compartimentés par des replis des tissus ovariens formant les lamelles ovigères. Dans les lamelles se trouvent des ovogonies, des ovocytes et des follicules en cours de développement. Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, dans l'ovaire des téléostéens, le nombre de follicules n'est pas fini ; en effet, les ovogonies sont capables de renouveler le stock par division cellulaire (pour revue : Jalabert, 2005).

Chez les femelles ovipares, l'ovocyte a la particularité de contenir une grande quantité de réserves qui serviront par la suite au développement de l'embryon et de la larve. Ces réserves sont accumulées au cours du processus de vitellogénèse. Celui-ci se compose de deux phases:

- La vitellogenèse endogène ou prévitellogenèse : Elle se caractérise par l'incorporation de gouttelettes lipidiques à l'intérieur du cytoplasme ovocytaire.
- La vitellogenèse exogène : Elle se caractérise par l'incorporation d'une lipoglycophosphoprotéine, la vitellogénine (Vtg) par l'ovocyte. La Vtg est produite par le foie sous le contrôle de E2 et libérée dans la circulation sanguine. Après liaison à son récepteur, la Vtg est endocytée par l'ovocyte.

Après cette période de croissance et avant l'ovulation, l'ovocyte est le lieu d'un ensemble de modifications (fin de la première division de méiose et entrée métaphase de la deuxième division) regroupée sous le nom de maturation ovocytaire.

L'ensemble du processus de folliculogénèse est sous le contrôle des gonadotropines, mais le rôle de chacune des hormones reste encore controversé. Chez les salmonidés, l'étude des profils d'expression des gonadotropines et de leurs récepteurs ont conduit les auteurs à suggérer une action de la FSH au cours de la croissance folliculaire alors que la LH interviendrait au moment de la maturation finale et de l'ovulation (Pour revue : Nagahama, 2000 ; Jalabert, 2005). En ce qui concerne la stéroïdogénèse, les deux hormones sont capables de stimuler *in vitro* la production de E2 et T dans des follicules intacts de saumon (Planas et al, 2000). Les gonadotropines agiraient pour cela via leurs récepteurs respectifs localisés pour les FSH-R dans les cellules de la thèque et de la granulosa et pour les LH-R dans les cellules de la granulosa (coho salmon : Yan et al, 1992 ; Miwa et al, 1994) (Figure 5).

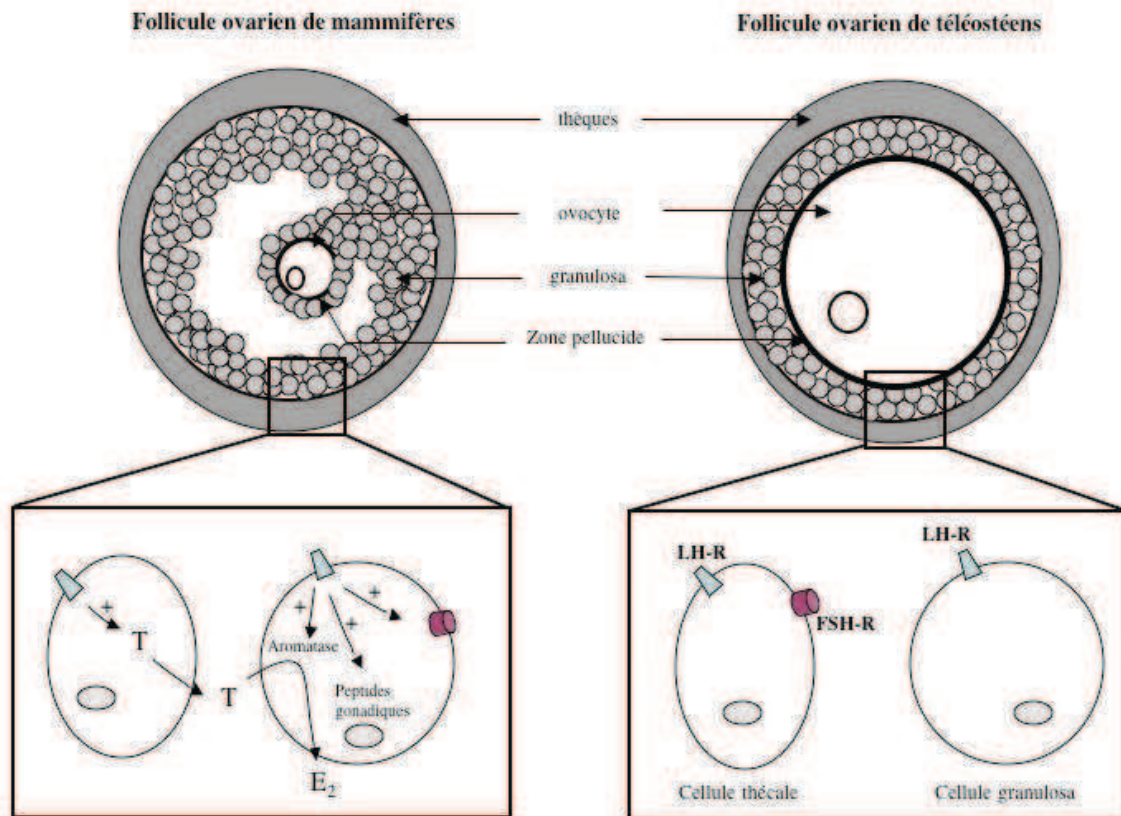


Figure 5 : Comparaison des follicules ovariens et de l'expression par les cellules folliculaires des récepteurs aux gonadotropines (LH-R et FSH-R). Chez les mammifères, les fonctions de LH et FSH sur les cellules folliculaires sont assez bien connues. En revanche, chez les téléostéens, les rôles des gonadotropines reste encore à déterminer.

4. Contrôle de la production des gonadotropines

Capables de contrôler l'état de développement des gonades, les hormones gonadotropes vont être soumises à de strictes régulations. Leurs synthèse et sécrétion sont contrôlées par deux voies différentes: le contrôle cérébral qui exerce son action directement au niveau des cellules gonadotropes hypophysaires, et le contrôle périphérique (exercé principalement par les gonades mais également par d'autres organes) qui peut intervenir à différents niveaux, directement au niveau des cellules gonadotropes hypophysaires ou indirectement via le contrôle cérébral.

4.1. Contrôle cérébral

4.1.1. La gonadolibérine

La gonadolibérine ou gonadotropin-releasing hormone (GnRH) est une neurohormone isolée dans les années 70 à partir d'hypothalamus de porc et de mouton (Matsuo et al, 1971, Amos et al, 1971). Cette neurohormone, composée de 10 acides aminés (décapeptide), a été décrite par Schally et ses collaborateurs comme un stimulateur aussi bien *in vivo* que *in vitro* de la sécrétion des hormones gonadotropes, LH et FSH, chez les mammifères (Schally et al, 1971). Suite à ces travaux, un nombre important d'études s'intéressant à ce neuropeptide ont été réalisées chez les mammaliens comme chez les non-mammaliens permettant la mise en évidence des différentes caractéristiques du système GnRH.

4.1.1.1. Structure

Depuis la purification de la GnRH mammalienne (mGnRH) en 1971, un grand nombre de variants ont été caractérisés et, à ce jour, 24 formes différentes de GnRH ont été décrites dont quatorze sont présents chez les vertébrés (pour revue : Kah et al, 2007).

Chez les vertébrés, toutes les formes sont synthétisées sous la forme d'un long précurseur, le préproGnRH, qui se compose d'un peptide signal, d'un peptide biologiquement actif (GnRH), d'un tripeptide de clivage et d'un peptide nommé GAP (GnRH-associated peptide).

La comparaison des séquences des différents variants connus montre qu'il existe 3 types de GnRH, chacun codé par un gène différent mais avec une structure conservée (4 exons et 3 introns) indiquant une origine évolutive commune (pour revue : Kah et al, 2007).

- Le type 1 comprend les précurseurs de différents variants peptidiques (mammalian GnRH, guinean pig GnRH, frog GnRH, sea bream GnRH, medaka GnRH, herringGnRH, whitefish GnRH, catfish GnRH, chicken GnRH I) selon les espèces. Cette forme, exprimée dans le cerveau antérieur, joue un rôle majeur dans le système hypophysiotrope. C'est à cette forme que nous nous référons dans notre travail.

- Le type 2 comprend les précurseurs de la chicken GnRH II. Chez tous les vertébrés étudiés, elle est exprimée dans la région du mésencéphale rostral.
- Le type 3 comprend les précurseurs de la salmon GnRH. Cette forme, exprimée dans le cerveau antérieur de certains téléostéens, participe au contrôle hypophysiotrope. (pour revue : Oka, 2002).

Chez l'anguille, deux formes de GnRH ont été retrouvées dans le cerveau : mGnRH et cGnRH II (King et al, 1990). D'abord mise en évidence chez l'anguille européenne par des techniques biochimiques (HPLC) et immunologiques (RIA) (King et al, 1990), les ADNc codant pour les précurseurs des deux formes mGnRH et cGnRH II ont par la suite été clonés chez l'anguille japonaise (Okuba et al, 1999).

4.1.1.2. Lieu de synthèse et action de la GnRH hypophysiotrope

a. Chez les mammifères

La GnRH est synthétisée par des neurones localisés dans l'hypothalamus médio-basal (pour les primates) et dans l'aire préoptique (pour les non primates) (pour revue : Caldani et Caraty, 1997). Ces neurones, isolés ou en petits groupes, projettent leurs axones vers l'éminence médiane où le décapeptide est libéré. La neurohormone parvient à ses cibles se trouvant dans l'hypophyse antérieure ou adénohypophyse par la voie du système porte hypothalamo-hypophysaire. Il consiste en un premier réseau de capillaires traversant l'éminence médiane, un vaisseau porte descendant la tige pituitaire et un second réseau de capillaires irriguant l'adénohypophyse (pour revue : Taragnat, 2001).

Au niveau de la cellule gonadotrope, qui chez les mammifères est capable de synthétiser à la fois LH et FSH, la GnRH exerce son action via un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (pour revue : Millar et al, 2004). Comme les autres récepteurs de cette famille, il possède 7 régions hydrophobes qui correspondent aux domaines transmembranaires. Ceux-ci contribuent à la formation de trois boucles extracellulaires entrant en jeu lors de la reconnaissance du ligand et de trois boucles intracellulaires nécessaires à la transduction du signal (pour revue : Stojilkovic et al, 1994 ; Millar et al, 2004).

Chez les mammifères, deux types de récepteurs ont été clonés (pour revue : Kah et al, 2007) :

- Le récepteur à GnRH de type I : Il ne possède pas de « queue » cytoplasmique à son extrémité C-terminale. Cette particularité du récepteur à GnRH mammalien a conduit certains auteurs à suggérer un rôle de l'extrémité C-terminale dans l'internalisation et la désensibilisation (Pawson et al, 1998 ; McArdle et al, 2002). Cette forme a été clonée chez l'homme et certains mammifères.
- Le récepteur de type II : Cette forme qui possède une queue C-terminale a été clonée chez certains mammifères et les vertébrés non-mammaliens. Elle serait absente chez l'homme et les rongeurs et non fonctionnelle chez les ovins et bovins.

Chez les mammifères, la GnRH est délivrée par les neurones hypothalamiques sous forme de pulses dont la fréquence va varier en fonction du moment du cycle. Les gonadotropines, synthétisées par la même cellule hypophysaire, vont avoir des sensibilités différentes à la fréquence des pulses de GnRH : la FSH répond à des fréquences lentes de GnRH alors que la LH est synthétisée pour des fréquences rapides. De plus, on observe également pour la LH une vraie sécrétion pulsatile complètement corrélée à celle de la GnRH, ce qui n'est pas le cas pour la FSH (pour revue : Counis et al, 2001).

b. Chez les téléostéens

Chez les téléostéens, l'axe hypothalamo-hypophysaire diffère de celui des mammifères sur plusieurs points (Figure 6).

Des études réalisées par immunohistochimie ou hybridation in situ chez différentes espèces ont permis de localiser les neurones à GnRH hypophysiotropes. Ils sont détectés au niveau du télencéphale ventral et de l'aire préoptique (Pour revue : Lethimonier et al, 2004). Contrairement à ce qui a été observé chez les mammifères, il n'y a pas de système vasculaire porte hypothalamo-hypophysaire chez les téléostéens. Les neurohormones sont libérées directement au contact des cellules cibles. Des travaux neuroanatomiques réalisés chez le poisson rouge (immunocytochimie, traceur rétrograde) ont permis de mettre en évidence une innervation directe de l'adénohypophyse par les neurones à GnRH (Anglade et al, 1993). Des

observations similaires ont été faites chez le poisson-chat (Dubois et al, 2000) et le gourami (Yamamoto, 2003).

La GnRH agit au niveau des différents types de cellules gonadotropes (chez les téléostéens, LH et FSH sont exprimées dans des cellules différentes) via un récepteur à GnRH de type II (avec une queue C-terminale) (pour revue : Kah et al, 2007).

Chez l'anguille européenne, une étude par immunocytochimie avait permis de localiser les neurones à mGnRH et à cGnRH II (les deux seules formes retrouvées chez l'anguille). Les corps cellulaires des neurones à mGnRH ont été observés dans les bulbes olfactifs, le télencéphale, l'aire préoptique et l'hypothalamus mediobasal ; les neurones à cGnRH II ont été localisés dans le mésencéphale (Montero et al, 1994). Cette distribution différentielle des corps cellulaires à mGnRH et cGnRH a été confirmée par les dosages des ARNm de leurs précurseurs respectifs par PCR quantitative en temps réel (Sébert et al, sous presse). Chez l'anguille, les dosages radioimmunologiques et les études immunocytochimiques ont montré que la GnRH hypophysiotrope majeure est la forme mGnRH, mais que quelques fibres à cGnRH II innervent aussi l'hypophyse (Dufour et al, 1989 ; Montero et al, 1994 ; Montero et al, 1995).

4.1.2. La dopamine

En plus du contrôle cérébral positif exercé sur les hormones gonadotropes par la GnRH, des études réalisées chez les téléostéens montrent l'existence d'un contrôle cérébral inhibiteur (Figure 6). Les premiers travaux mettant en évidence ce contrôle négatif ont été réalisés chez le poisson rouge par Peter et Paulencu (1980). Après des expériences de lésions cérébrales, les auteurs ont pu observer une augmentation des taux plasmatiques en LH (décharge ovulante) et des ovulations. Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer l'existence d'un contrôle inhibiteur des gonadotropines appelé, dans un premier temps, « GRIF » (gonadotropin-release inhibiting factor) (Peter et Paulencu, 1980). Par la suite, des études à la fois *in vivo* et *in vitro* ont permis d'identifier le GRIF comme étant la dopamine (Kah et al, 1987).

La dopamine (DA) est un neuromédiateur synthétisé à partir de l'acide aminé tyrosine. Elle fait partie de la famille des catécholamines. Chez les vertébrés, où l'organisation des systèmes catécholaminergiques au niveau central est assez bien conservée, les neurones dopaminergiques sont distribués dans l'ensemble du cerveau (Smeets et Gonzalez, 2000).

Les neurones dopaminergiques impliqués dans le contrôle des gonadotropines chez les téléostéens sont localisés dans l'aire préoptique antérieure et émettent des projections jusque dans l'hypophyse (poisson rouge : Kah et al, 1987 ; Anglade et al, 1993 ; anguille : Vidal et al, 2004 ; Weltzien et al, 2006). La dopamine va agir sur les cellules hypophysaires gonadotropes via un récepteur de type D2 (pour revue : Peter et al, 1986 ; Pasqualini et al, 2004).

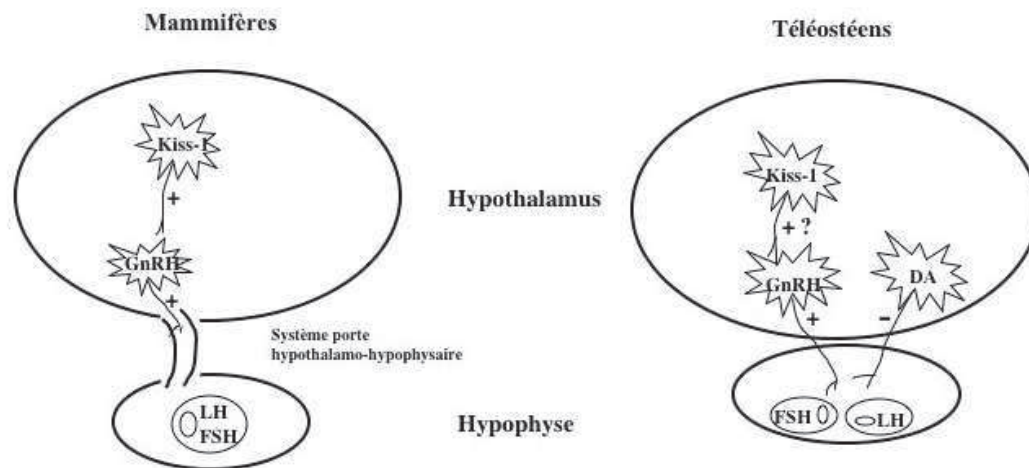


Figure 6 : Comparaison du contrôle cérébral des gonadotropines et de la jonction hypothalamo-hypophysaire chez les mammifères et chez les téléostéens. Chez certains téléostéens, en plus du contrôle stimulateur par la GnRH, les gonadotropines sont soumises à un contrôle inhibiteur exercé par la DA. Chez les mammifères, la GnRH est libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et va agir au niveau de la cellule gonadotrope synthétisant à la fois LH et FSH. Au contraire, chez les téléostéens, les neurohormones (GnRH et DA) agissent directement au niveau des deux types cellulaires gonadotropes.

Le contrôle négatif des gonadotropines par la DA, d'abord mis en évidence chez le poisson rouge a, par la suite, été caractérisé chez de nombreux téléostéens (poisson-chat : De Leeuw et al, 1986 ; carpe et loche chinoise : Lin et al, 1988 ; truite arc-en-ciel : Saligaut et al, 1999 ; tilapia : Yaron et al, 2003) et semble avoir un rôle important en fin de gamétogenèse pour le contrôle de la maturation ovocytaire et l'ovulation chez la femelle et la spermiation chez le mâle. Ces observations ont permis, en aquaculture, le développement de la méthode d'induction de l'ovulation « Linpe » qui consiste en une injection d'un antagoniste de la dopamine associé à un agoniste de la GnRH (Peter et al, 1988). Néanmoins, certaines espèces de téléostéens semblent dépourvues de ce contrôle inhibiteur exercé par la dopamine (tambour brésilien : Copeland et Thomas, 1989 ; daurade royale : Zohar et al, 1995).

Jusqu'à aujourd'hui, le rôle de la dopamine dans le contrôle de la puberté n'a été étudié que chez quelques espèces (pour revue : Dufour et Rousseau, 2007). Chez l'anguille

européenne (bloquée à un stade prépubère lorsque la migration est empêchée), différents travaux ont montré l'importance du système dopaminergique dans le contrôle de la synthèse et de la libération de la LH (Dufour et al, 1988 ; Vidal et al, 2004). Le système dopaminergique jouerait également un rôle dans l'initiation de la puberté chez le platax atlantique (*Chaetodipterus faber*) où une baisse des taux de monoamines hypothalamiques a été observée en début de puberté (Marcano et al, 1995). Enfin, une récente étude réalisée chez le mulot (*Mugil cephalus*) suggère également un rôle du système dopaminergique dans le contrôle de la puberté ; les auteurs ayant observé une diminution de l'expression des récepteurs dopaminergiques de type D2 dans le cerveau et l'hypophyse au cours du processus pubertaire (Nocillado et al, 2007). En revanche, il a été montré chez le bar américain que la DA n'intervenait pas dans le contrôle des gonadotropines au moment de l'initiation de la puberté (Holland et al, 1998).

Chez un grand nombre de téléostéens, la synthèse et la sécrétion des gonadotropines sont donc sous un double contrôle cérébral exercé par deux neurohormones, l'une stimulatrice (GnRH) et l'autre inhibitrice (dopamine) (pour revue : Dufour et al, 2005).

4.1.3. La kisspeptine

Produit du gène kiss-1, la kisspeptine (aussi nommé métastine) a dans un premier temps été caractérisée comme un suppresseur de métastases des mélanomes (Lee et al, 1996). Les différents produits du gène provenant d'un épissage alternatif (kisspeptine-54 : Ohtaki et al, 2001 ; kisspeptine-14, kisspeptine-13 et kisspeptine-10 : Kotani et al, 2001) et le récepteur (GPR54 : Kotani et al, 2001 ; Muir et al, 2001 ; Ohtaki et al, 2001) ont par la suite été identifiés.

C'est en 2003 que sont reportées les premières données concernant un rôle du système Kiss-1/GPR54 dans le contrôle de la reproduction. Trois groupes ont simultanément décrit les effets de knock-out (chez la souris : Seminara et al, 2003 ; Funes et al, 2003) et de mutation (chez l'humain : de Roux et al, 2003) du gène GPR54, récepteur de la kisspeptine. Ils ont observé que lorsque le gène GPR54 était absent ou muté, les individus (souris ou humains) n'étaient pas capables de faire leur puberté, leurs appareils reproducteurs étaient hypoplasiques, les concentrations en stéroïdes sexuels et en gonadotropines (LH et FSH) étaient faibles et les individus stériles.

Ces résultats révélaient l'implication du système Kiss-1/GPR54 dans le déclenchement de la puberté et donc le contrôle de l'axe reproducteur. A travers différentes études, les auteurs ont donc cherché à comprendre où et comment le système intervenait.

Seminara et ses collaborateurs ont montré, chez la souris KO pour le gène GPR54 (GPR54 -/-), que le contenu cérébral en GnRH reste normal et que les cellules gonadotropes sont capables de répondre à une stimulation par de la GnRH exogène (Seminara et al, 2003). De plus, il a été montré chez ces mêmes souris GPR54 -/- que l'anatomie, la localisation et les projections des neurones GnRH vers l'éminence médiane étaient normales (Messenger et al, 2005). Ces résultats permettaient de suggérer que les perturbations observées chez ces souris n'étaient le fait ni d'un défaut de migration des neurones à GnRH, ni d'un défaut de fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire mais plus probablement le fait d'un défaut de libération de GnRH.

Par ailleurs, des travaux réalisés chez différents modèles animaux ont montré que des injections de kisspeptine étaient capables d'induire la libération des gonadotropines hypophysaires (Gottsch et al, 2004 ; Matsui et al, 2004 ; Thompson et al, 2004 ; Dhillon et al, 2005 ; Messenger et al, 2005) ; un effet aboli lorsque les animaux sont prétraités avec un antagoniste de la GnRH (Matsui et al, 2004 ; Gottsch et al, 2004) suggérant une action de la kisspeptine via les neurones à GnRH. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence de récepteurs GPR54 au niveau des neurones à GnRH chez les mammifères (Messenger et al, 2005) (Figure 6).

Au niveau hypophysaire, de récents travaux ont montré que la kisspeptine et son récepteur GPR54 étaient exprimés par les cellules de l'hypophyse (Gutierrez-Pascual et al, 2007). De plus, des traitements par la kisspeptine sont capables d'induire *in vitro* l'activation des cellules gonadotropes et la libération de LH (rat : Gutierrez-Pascual et al, 2007 ; bovin et porc : Suzuki et al, 2008). Ces résultats indiquent que la kisspeptine peut également exercer un rôle directement au niveau des cellules hypophysaires.

Chez les poissons téléostéens, les données concernant le système Kiss-1/GPR54 sont encore peu nombreuses. A ce jour, le récepteur GPR54 a été cloné chez quelques espèces: le tilapia (*Oreochromis niloticus* : Parhar et al, 2004), le mullet (*Mugil cephalus* : Nocillado et al, 2007), le cobia (*Rachycentron canadum* : Mohamed et al, 2007), le poisson zèbre (*Danio rerio* : Van Aerle et al, 2008) et chez *Pimephales promelas* (Filby et al, 2008) suggérant l'existence du système kiss-1/GPR54. De plus, quelques données concernant l'expression du

récepteur GPR54 au cours du processus pubertaire et de la maturation gonadique indiquent un possible rôle du système kiss-1/GPR54 dans le contrôle de l'axe gonadotrope (mulet : Nocillado et al, 2007 ; cobia : Mohamed et al, 2007). Enfin, la kisspeptine a récemment été clonée chez le poisson zèbre (Van Aerle et al, 2008).

D'autres facteurs cérébraux sont capables de participer à la régulation de la production et/ou de la libération des hormones gonadotropes. On peut mentionner la noradrénaline (poisson rouge : Yu et Peter, 1992 ; truite arc-en-ciel : Saligaut et al, 1992 ; tambour brésilien : Khan et Thomas, 1992 ; poisson-chat : Senthilkumaran et Joy, 1996), le « pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide » (pour revue Yaron et al, 2001) ou encore le neuropeptide Y (poisson rouge : Kah et al, 1989 ; truite arc-en-ciel et carpe: Breton et al, 1989, 1991).

4.2. Contrôle périphérique

4.2.1. Rétrocontrôles stéroïdiens

Les gonadotropines, responsables de la synthèse et la libération des stéroïdes gonadiques, vont à leur tour être soumises à des rétrocontrôles stéroïdiens.

Chez les mammifères, les premières données obtenues par des expériences de castration / supplémentation ont permis de révéler les rétrocontrôles négatifs exercés par les stéroïdes sexuels. On peut en effet observer de fortes élévations des taux plasmatiques et des contenus hypophysaires en gonadotropines après castration. Cette réaction est quasi complètement supprimée lorsque les animaux castrés sont traités par des injections de stéroïdes (pour revue : Gharib et al, 1990).

En revanche, à certains moments du cycle, les stéroïdes sexuels peuvent exercer des rétrocontrôles positifs. Par exemple, chez la femme, où la décharge ovulante (pic de LH) est induite par l'augmentation nette de l'oestradiol (E2) plasmatique qui précède.

Ces rétrocontrôles, qui peuvent s'exercer directement au niveau hypophysaire ou indirectement via l'hypothalamus (Figure 7), ont été le sujet de multiples travaux qui ont permis de mettre en évidence des effets différentiels des stéroïdes sur l'expression des messagers, la synthèse et la libération de LH et FSH (Pour revue : Gharib et al, 1990 ; Counis,

1990 ; Burger et al, 2004). Par exemple, chez le rat, des modifications dans la transcription des sous-unités des gonadotropines sont induites par les oestrogènes comme par les androgènes. Concernant les sous-unités α et LH β , les effets des stéroïdes in vivo sont majoritairement inhibiteurs. En ce qui concerne la sous-unité FSH β , le système semble un peu plus complexe, la testostérone (T) n'ayant pas d'effet ou stimulant FSH β et E2 ayant plutôt un effet inhibiteur (pour revue : Gharib et al, 1990 ; Counis et Jutisz, 1991 ; Burger et al, 2004). De plus, chez les mammifères, les sites et les modes d'action des stéroïdes sexuels dans le contrôle de l'expression des gonadotropines diffèrent en fonction des espèces (pour revue : Burger et al, 2004).

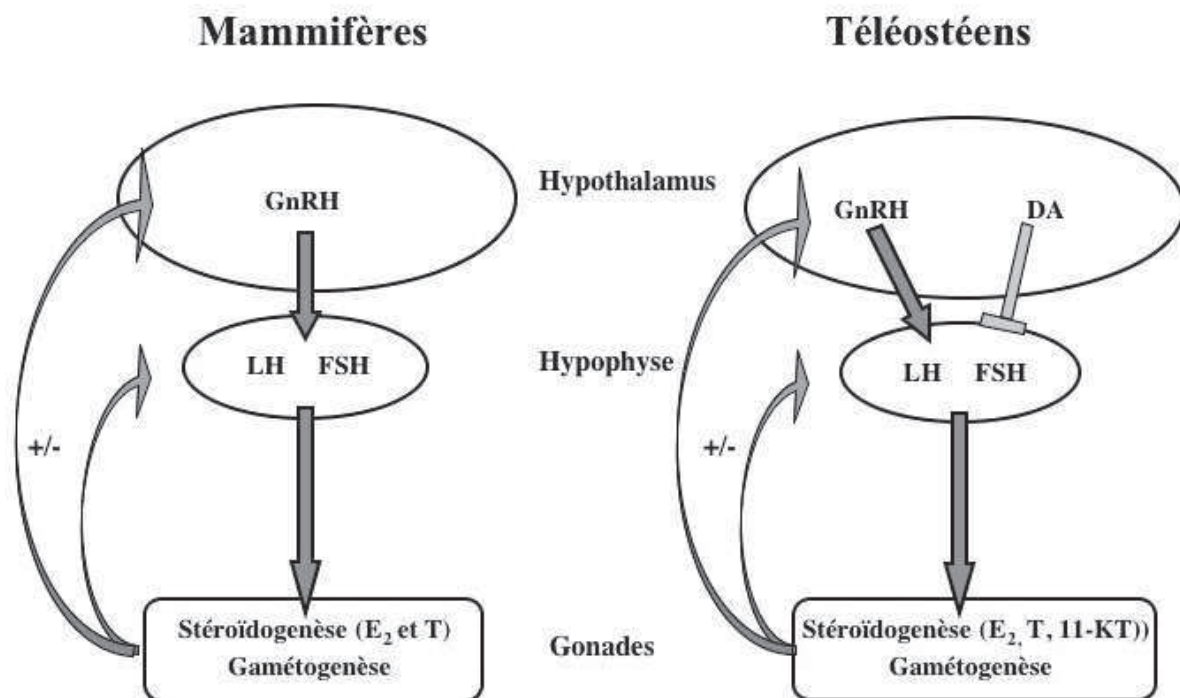


Figure 7 : Comparaison de l'axe gonadotrope chez les mammifères et les téléostéens.

Chez les téléostéens, les stéroïdes sexuels exercent également des actions positives et négatives sur l'expression des gonadotropines (Figure 7). Celles-ci vont varier en fonction des espèces et du moment du cycle. Étant donné que la LH a longtemps été considérée comme étant la seule gonadotropine existant chez les poissons, la majorité des travaux réalisés concernent les effets des stéroïdes sexuels sur l'expression et la sécrétion de la LH. Néanmoins, la découverte de la FSH et la mise en place de nouveaux outils moléculaires permettent aujourd'hui d'étudier la FSH.

Les premiers travaux réalisés par Billard et ses collaborateurs (1977) chez la truite arc-en-ciel mettaient en évidence les effets inhibiteurs des stéroïdes sexuels. Après castration, les auteurs ont pu observer une élévation des taux plasmatiques de LH, celle-ci pouvant être corrigée par l'administration de stéroïdes. Par la suite, des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres espèces (carpe : Billard et al, 1977 ; poisson-chat : De Leeuw et al, 1986 ; poisson rouge : Kobayashi et Stacey, 1990). Des rétrocontrôles négatifs ont également été observés concernant FSH chez le saumon coho après traitement par de l'E2 (Dickey et Swanson, 1998).

Parallèlement à cela, des effets stimulateurs des stéroïdes sexuels, retrouvés majoritairement chez les juvéniles, sur la LH comme sur la FSH ont été décrits chez différentes espèces (truite arc-en-ciel : Crim and Evans, 1979 ; saumon coho : Dickey and Swanson, 1998; poisson rouge : Huggard-Nelson et al, 2002).

Chez l'anguille européenne, les premiers travaux réalisés en 1983 ont permis de mettre en évidence un effet stimulateur des stéroïdes sexuels sur le contenu hypophysaire en hormone LH (Dufour et al, 1983b). Puis, après clonage des sous unités α et LH β , des travaux focalisant sur le contrôle de leurs expressions mettaient en évidence un effet stimulateur de E2 et T dans l'expression des ARNm des sous unités α et LH β (Counis et al, 1987 ; Quérat et al, 1991). Enfin des travaux réalisés in vitro sur culture primaire de cellules hypophysaires ont permis de révéler les effets indirects et directs hypophysaires des stéroïdes (Huang et al, 1997).

Jusqu'à présent, les travaux réalisés chez l'anguille se sont exclusivement intéressés au contrôle de la LH.

L'obtention de nouveaux outils moléculaires et l'étude des rétrocontrôles stéroïdiens exercés sur la FSH sont un des sujets traités au cours de mon travail de thèse (articles 1, 2, 3).

4.2.2. Les peptides gonadiques

Dans un premier temps, isolés à partir des fluides gonadiques chez le porc, les « peptides gonadiques » ont été décrits comme des facteurs non stéroïdiens capables de moduler la sécrétion de la FSH.

Il existe trois types de peptides gonadiques : activines, inhibines et follistatines. Les activines sont capables de stimuler la synthèse et la sécrétion de la FSH par l'hypophyse (Vale et al, 1986; Ling et al, 1986; Carroll et al, 1989) ; alors que follistatines (FS) et

inhibines inhibent la synthèse et la sécrétion de la FSH (inhibines : Miyamoto et al, 1985 ; Rivier et al, 1985; Robertson et al, 1985 Carroll et al, 1989 ; follistatines : Esch et al, 1987 ; Robertson et al, 1987 ; Ueno et al, 1987).

Activines et inhibines sont des protéines dimériques formées à partir de trois gènes distincts : α , β_A et β_B . Elles appartiennent à la famille des TGF- β (transforming growth factors- β). Les inhibines résultent de l'association d'une sous-unité α et d'une sous-unité β ($\alpha\beta_A$ ou $\alpha\beta_B$), et les activines de l'association de deux sous-unités β ($\beta_A\beta_A$ ou $\beta_B\beta_B$ ou $\beta_A\beta_B$).

Comme les autres membres de la famille des TGF β , les activines exercent leur action via des récepteurs de type sérine/thréonine kinase (pour revue : Mathews, 1994 ; Massagué, 1996). L'activine se lie à un récepteur de l'activine de type II puis ce complexe recrute un récepteur de l'activine de type I. Le récepteur de type II transphosphoryle le récepteur de type I qui une fois activée stimule une famille de protéines appelées Smad (pour revue : Attisano et Wrana, 1998 ; Peng et Mukai, 2000) (Figure 8).

En ce qui concerne le mode d'action des inhibines, différents modèles sont proposés : 1) elles seraient capables de se lier au récepteur de l'activine de type II et empêcheraient le recrutement du récepteur de type I et la transduction du signal ; elles agiraient donc comme des antagonistes des activines (Xu et al, 1995). 2) Certains travaux suggèrent une action spécifique des inhibines exercée via des récepteurs aux inhibines (Gray et al, 2001).

Le troisième type de peptide gonadique, la follistatine (FS), est une protéine glycosylée capable de lier spécifiquement les activines et de neutraliser leur action en empêchant la liaison des activines à leurs récepteurs (De Winter et al, 1996) (Figure 8).

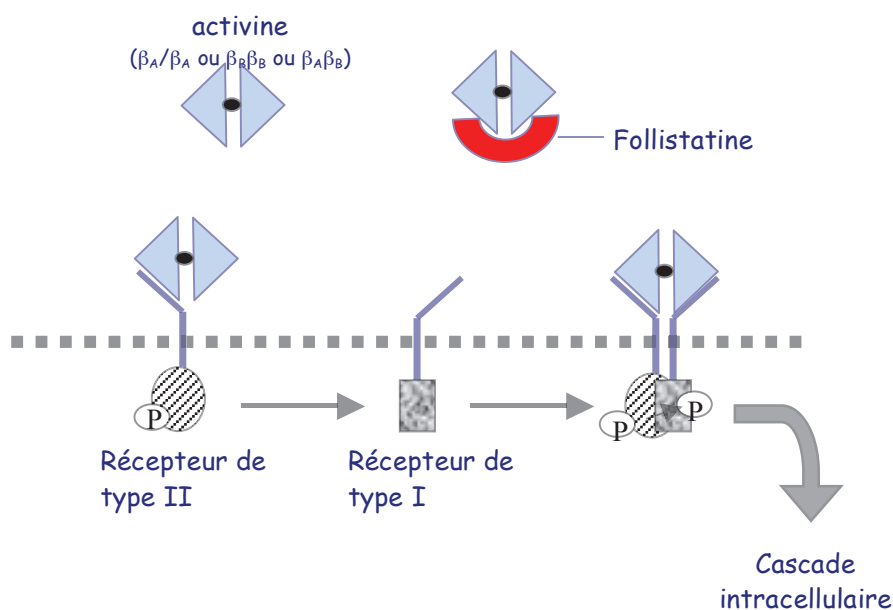


Figure 8 : Représentation schématique du système activine – follistatine.

Chez les mammifères, différents travaux ont montré que, en plus de leur expression au niveau des gonades, les trois types de peptides sont également exprimés dans un grand nombre de tissus incluant l'hypophyse (Michel et al, 1990 ; Bilezikjian et al, 1993). Ceci suggère des actions au niveau local de ces hormones, qui exerceraient des contrôles autocrines/paracrines sur les gonatotropines.

Chez les téléostéens, les peptides gonadiques et leurs effets ont fait l'objet de peu d'études. Les premiers travaux suggérant l'existence d'un système activine/inhibine dans le contrôle des gonatotropines ont été obtenus dans les années 90 chez le poisson rouge par des études de l'effet de fluide folliculaire ainsi que d'activine et d'inhibine de porc sur la sécrétion de GTH (Ge et al, 1992). Par la suite, les séquences partielles ou complètes des ADNc codant pour les sous-unités β de l'activine ont été clonées chez différentes espèces de téléostéens : le poisson rouge (Ge et al, 1997, 1999), le poisson zèbre (Wittbrodt and Rosa, 1994; Rodaway et al, 1999), l'anguille japonaise (Miura et al, 1999), la truite arc-en-ciel (Tada et al, 1998), la carpe (Tada et al, 2000), le medaka (Tada et al, 2000). La sous-unité α de l'inhibine a récemment été clonée chez le medaka (Zhang et al, Accession N° EU159465). Enfin, les clonages des récepteurs de type I et II de l'activine ont été réalisés chez le poisson rouge (pour revue : Ge, 2000) et le poisson zèbre (Yelick et al, 1998 ; Garg et al, 1999).

Jusqu'à aujourd'hui, les fonctions physiologiques du système activine / inhibine / follistatine dans le contrôle des gonatotropines chez les téléostéens ont été peu étudiées et les données disponibles ont été en majorité obtenues chez une seule espèce : le poisson rouge.

Les études réalisées sur culture de cellules hypophysaires montrent que, comme chez les mammifères, l'activine est capable de stimuler l'expression de la sous-unité FSH β , mais contrairement à ce qui a été observé chez les mammifères, l'activine apparaît également capable de moduler l'expression de la sous-unité LH β (Yam et al, 1999).

Concernant la follistatine (FS), les premiers résultats obtenus sur des cultures de cellules hypophysaires de poisson rouge ont montré que la follistatine recombinante de porc était capable de contrôler de façon différentielle l'expression des sous-unités des gonatotropines (Yuen and Ge, 2004).

Comme chez les mammifères, les « peptides gonadiques » sont exprimés chez le poisson rouge dans un grand nombre de tissus incluant le cerveau, l'hypophyse et les gonades (Lau and Ge, 2005 ; Cheng et al, 2007) suggérant des actions autocrines/paracrines au niveau des gonatotropines.

D'autres facteurs périphériques sont également susceptibles de jouer un rôle dans le contrôle des gonadotropines, particulièrement au moment de la puberté. Au cours de cette période pubertaire, toute une somme d'informations concernant les conditions environnementales mais également concernant les conditions internes de l'organisme (croissance et accumulation de réserves suffisantes) vont conduire à l'activation de l'axe gonadotrope. Il a été montré que des facteurs intervenants dans la régulation de la croissance ou du métabolisme comme l'IGF I (pour revue : mammifères, Daftary et Gore, 2005 ; poissons, Okuzawa, 2002), la leptine (pour revue : mammifères, Blüher et Mantzoros, 2007 ; poissons, Okuzawa, 2002) ou le cortisol (pour revue : Brann et Mahesh, 1991) pouvaient être impliqués dans l'activation de l'axe gonadotrope.

Chez l'anguille, les études sur le rôle des facteurs métaboliques dans le contrôle de la fonction gonadotrope n'ont porté jusqu'à présent que sur la LH (Huang et al, 1998, 1999).

5. Objectifs de la thèse

Le stade argenté est le dernier stade accessible dans des conditions naturelles. En effet, la maturation sexuelle dans des conditions naturelles n'a jusqu'à aujourd'hui jamais été observée, les anguilles restant « bloquées » à un stade prépubère si la migration océanique de reproduction est empêchée.

Or, ce blocage à un stade juvénile est dû à un déficit de production des hormones gonadotropes (pour revue : Dufour et al, 2003). Cette particularité de l'anguille en fait un modèle particulièrement intéressant d'un point de vue biologique, en permettant l'étude des mécanismes de déclenchement ou d'inhibition de la puberté.

De plus, l'anguille présente un intérêt évolutif ; en effet, appartenant à un groupe phylogénétiquement ancien de téléostéens, les Elopomorphes, elle permet l'accès à des régulations ancestrales.

Enfin, cette recherche s'inscrit dans un contexte particulier de très fortes diminutions des stocks d'anguilles qui atteignent actuellement un stade critique pour la survie des espèces (Stone, 2003). Comprendre les mécanismes de régulations de l'axe gonadotrope est donc un des enjeux majeurs si l'on veut pouvoir un jour maîtriser la reproduction de l'anguille.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à caractériser les facteurs internes capables de jouer un rôle dans le contrôle de l'expression des hormones gonadotropes, LH et FSH. Pour cela, nous avons travaillé en différentes étapes :

- Nous avons développé les outils moléculaires nécessaires à la mesure de l'expression des sous-unités des gonadotropines.
- A l'aide de ces outils, nous avons suivi l'expression des gonadotropines au cours de deux phases critiques du cycle biologique :
 - La phase d'argenteure : Qualifiée de métamorphose secondaire, elle correspond au passage du stade sédentaire jaune au stade migrateur argenté et coïncide également avec le début du développement gonadique. Cette étude a été réalisée sur des échantillons de terrain en collaboration avec le Cemagref.
 - La phase de maturation gonadique : Elle a été induite expérimentalement à l'aide de traitements gonadotropes et réalisée en collaboration avec le Cemagref.
- Nous avons cherché parmi les facteurs périphériques (stéroïdes sexuels, peptides gonadiques, hormones métaboliques) lesquels étaient capables de participer aux régulations différentielles de l'expression des gonadotropines observées au cours du cycle. Pour cela, nous avons étudié chez des anguilles femelles argentées:
 - L'effet des stéroïdes sexuels *in vivo* (par injections) et *in vitro* (par traitements de cultures primaires de cellules hypophysaires) sur l'expression des gonadotropines.
 - L'effet des peptides gonadiques (activine et follistatine) *in vitro*
 - L'effet de facteurs métaboliques (IGF-I, leptine et cortisol) *in vitro*

Cette étude nous permet d'apporter des résultats nouveaux sur les mécanismes de la régulation différentielle des deux gonadotropines chez l'anguille et chez les téléostéens, ainsi que sur la conservation et l'évolution de ces régulations chez les vertébrés.

II. MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie, nous allons brièvement présenter les différentes méthodes utilisées au cours de ce travail de thèse. Les protocoles sont plus largement détaillés dans les articles présentés dans la partie « Résultats ».

1. Animaux et expérimentations *in vivo* (Articles 1, 2, 3)

1.1. Provenance des animaux

Les anguilles étudiées dans ce travail appartiennent à l'espèce européenne *Anguilla anguilla*. Elles ont été pêchées soit au cours de leur phase sédentaire (stade jaune) dans la Somme ou le Rhin, soit au moment de leur migration d'avalaison (stade argenté) dans la Somme, le Rhin ou la Loire.

1.2. Etude de terrain

Les anguilles ont été capturées par pêche électrique (Conseil Supérieur de la Pêche) ou par filet (pêcheurs professionnels) dans la Somme et le Rhin sur trois périodes de pêche entre 1994 et 2002. Toutes les anguilles ont été disséquées sur place (Article 2 et données complémentaires).

1.3. Traitements hormonaux

1.3.1. Traitements par les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes (Articles 1, 2, 3)

Après avoir été transportées au laboratoire (MNHN, Paris), les anguilles en provenance de la Loire sont conservées dans des bacs de mille litres alimentés en eau de ville filtrée, continuellement renouvelée et aérée. La température moyenne de l'eau sur l'année est de 13,5 °C avec une variation de plus ou moins deux degrés. Les anguilles sont ensuite transférées par petits lots (4 anguilles / aquarium) dans des aquariums de cent litres alimentés en eau de ville filtrée, continuellement renouvelée et aérée.

Les anguilles reçoivent une injection hebdomadaire, pendant 2 à 3 mois, dans la cavité périspéciale soit d'une suspension dans une solution saline de 2µg d'hormone (oestradiol : E₂, testostérone : T, dihydrotestostérone : DHT, Thyroxine : T₄) (Sigma) par g de poids corporel (anguilles traitées), soit de solution saline seule (anguilles témoins). Le même protocole a été utilisé lors d'expérimentations précédentes recherchant les effets des stéroïdes sexuels (Montéro et al, 1995 ; Huang et al, 1999) ou des hormones thyroïdiennes (Rousseau et al, 2002) sur différentes cibles cérébrales ou hypophysaires.

1.3.2. Traitements gonadotropes (Article 1)

Les expériences de traitements gonadotropes pour l'induction expérimentale de la maturation sexuelle ont été réalisées au Cemagref de Bordeaux. Les anguilles pêchées dans la Loire sont transportées à la station du Cemagref, où elles sont, durant trois semaines, progressivement acclimatées à une salinité de 34‰. Les bassins étant placés sous un abri en plastique (type serre), la température de l'eau et la photopériode varient avec les conditions naturelles (T°: 8°C_{janvier}-26°C_{juin}).

Les anguilles femelles argentées reçoivent une injection hebdomadaire d'extrait d'hypophyse de carpe (20µg/g poids corporel) dans la cavité périspéciale selon le protocole mis au point par Fontaine et ses collaborateurs (1964) et ce jusqu'à 16 semaines (Article 1). Les anguilles mâles reçoivent une injection hebdomadaire de gonadotropine chorionique (hCG, 1UI/g poids corporel) dans la cavité périspéciale selon le protocole mis au point par Fontaine (1936) pendant 8 semaines (données complémentaires). Des lots d'anguilles témoins et traitées sont sacrifiés à différents temps au cours de l'expérimentation.

Ces expérimentations ont été réalisées dans le cadre du projet européen EELREP (n°Q5RS-2001-01836).

2. Prélèvements

À la fin des expérimentations, les anguilles sont pesées avant d'être sacrifiées par décapitation et différents tissus sont prélevés.

2.1. Sang

Après sacrifice de l'anguille, le sang est prélevé, à la sortie de l'aorte ventrale, dans des tubes héparinés. Après centrifugation, le plasma est récupéré, aliquoté et stocké à -20°C (Article 2).

2.2. Hypophyse

2.2.1. Pour dosages radioimmunologiques des hormones (RIA)

Après décapitation de l'anguille, l'hypophyse est prélevée, placée dans 0.5ml de NaCl (0.15M) et conservé à -20°C . L'extraction est réalisée par sonication (Bioblock Scientific, Illkirch, France); après centrifugation, le surnageant est récupéré et conservé à -20°C jusqu'au dosage (Article 2).

2.2.2. Pour dosages des ARNm (dot blot et PCR quantitative)

Après décapitation de l'anguille, l'hypophyse est prélevée, congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C (Article 1). Dans les expérimentations suivantes, les hypophyses sont rapidement prélevées et déposées dans une solution assurant la conservation des ARNs, la RNA later (Ambion); les hypophyses sont ensuite stockées à -20°C (Articles 2 et 3).

2.2.3. Pour marquage par hybridation *in situ* des cellules gonadotropes (Article 1)

Les anguilles sont anesthésiées par immersion dans une solution contenant des esters d'acide benzoïque et perfusées à travers le bulbe aortique avec une solution saline puis un fixateur (paraformaldéhyde 4% dilué dans du tampon phosphate).

L'ensemble cerveau – hypophyse est disséqué et placé dans une solution de fixation à 4°C . Il est ensuite rincé dans du tampon phosphate (PBS) et plongé, pour la cryoprotection, dans une solution de sucrose à 4°C . Les tissus sont ensuite congelés dans de l'isopentane froid et stockés à -80°C .

2.3. Gonades et tractus digestif

2.3.1. Pour le calcul des rapports gonado-somatique et tractus digestif-somatique

Après incision de l'abdomen, les gonades et le tractus digestif sont prélevés et pesés pour le calcul des rapports gonado-somatique (RGS = % poids des gonades/ poids total du corps) et tractus digestif-somatique (RTDS = % poids du tractus digestif/poids total du corps).

2.3.2. Pour étude histologique (Article 2)

Après incision de l'abdomen, un échantillon d'environ 2 cm de gonades (ovaire) est prélevé en amont de l'anus et fixé dans une solution de Bouin aqueux (acide picrique, acide acétique et formaldéhyde).

3. Expérimentations *in vitro* (Articles 3, 4 et données complémentaires)

3.1. Provenance des animaux

Les anguilles utilisées pour les expérimentations *in vitro* sont des anguilles femelles capturées au moment de leur migration d'avalaison par des pêcheurs professionnels dans la Loire. Après avoir été transportées au laboratoire (MNHN, Paris), les anguilles sont conservées dans des bacs de mille litres alimentés en eau de ville filtrée, continuellement renouvelée et aérée.

3.2. Culture primaire de cellules hypophysaires et traitements hormonaux

Après décapitation, les hypophyses sont prélevées et soumises à une méthode de dispersion enzymatique et mécanique mise au point par Montero et al (1996). Pour résumer, les hypophyses sont découpées et incubées à 25°C dans une solution de trypsine facilitant la dissociation. Après arrêt de la réaction enzymatique, une dispersion mécanique des cellules est réalisée par passages répétés à travers une pipette en plastique. Après estimation du nombre de cellules et de leur viabilité par un test d'exclusion au Bleu de Trypan, les cellules sont déposées à des densités variables (de 20000 à 80000 cellules/puits) dans des boîtes de

cultures de 96 puits prétraitées à la poly-L-lysine permettant de faciliter l'adhésion des cellules. Les cellules sont incubées dans un milieu de culture M199 (contenant sels de Earle et bicarbonate de sodium) auquel sont ajoutés pénicilline, streptomycine et fungizone (Gibco/Invitrogen). La culture est maintenue à 18°C sous une atmosphère saturée en humidité et à 3% de CO₂. (articles 3, 4 et données complémentaires).

3.3. Traitements des cellules

3.3.1. Traitements stéroïdiens (Articles 3 et données complémentaires)

Des solutions stock d'oestradiol (E₂), de testostérone (T), de dihydrotestostérone (DHT) ou de cortisol (F) (Sigma) sont préparées à des concentrations de 10⁻³ M dans l'éthanol et stockées à 4°C. Toutes les 72h, des solutions intermédiaires sont préparées par dilution des solutions stocks dans le milieu de culture. Les solutions intermédiaires sont ensuite ajoutées aux puits de culture de manière à obtenir une concentration finale par puits de 10⁻⁸M ou 10⁻⁷ M. Les puits témoins sont traités par le solvant (éthanol) à la même dilution. La concentration finale en éthanol dans les puits n'excède jamais 0.01%. Les milieux de culture et traitements sont renouvelés tous les 3 jours. Après 9 jours, les cultures sont arrêtées.

3.3.2. Traitements par les peptides gonadiques (Article 4)

Des solutions stock d'activine B recombinante humaine et de follistatine recombinante humaine (R&D Systems, Lille, France) à des concentrations respectives de 5x10⁻⁵ M et 5x10⁻⁶ M sont préparées dans du tampon phosphate (PBS) et stockées à 4°C. Des solutions intermédiaires sont préparées avant chaque traitement par dilution des solutions stock dans le milieu de culture. Les concentrations finales testées dans les puits de culture vont de 10⁻¹²M à 10⁻⁶M. Les puits témoins sont traités par le solvant (PBS). Les milieux de culture et traitements sont renouvelés tous les 3 jours. Les cultures sont arrêtées à différents temps jusqu'à 9 jours.

3.3.3. Traitements par les hormones métaboliques (données complémentaires)

Une solution stock d'insulin-like growth factor 1 (IGF-I) recombinant humain (Sigma) est préparée à une concentration de 10⁻⁴ M dans de l'eau pure, aliquotée et conservée à -20°C.

Les concentrations finales testées dans les puits de culture vont de 10^{-11} M à 10^{-7} M. Une solution stock de leptine recombinante humaine (Sigma) est préparée à une concentration de 10^{-4} M dans une solution de HCl (15mM), aliquotée et conservée à -20°C . Les concentrations finales testées dans les puits de culture sont de 10^{-8} M et 10^{-6} M. Les puits témoins sont traités par le solvant. Les milieux de culture et traitements sont renouvelés tous les 3 jours. Les cultures sont arrêtées après 9 jours.

3.3.4. Lyse cellulaire (Articles 3, 4 et données complémentaires)

Les ARN totaux des cellules hypophysaires sont extraits directement dans le puits de culture à l'aide du kit Cell-to-cDNATM II (Ambion). Les cellules de chaque puits sont rincées à l'aide d'un tampon phosphate (PBS) froid, puis lysées à l'aide d'une solution de lyse, le Cell Lysis II buffer. Le lysat obtenu va ensuite être soumis à un traitement par la déoxyribonucléase I (Ambion) puis conservé à -80°C .

4. Clonage de la sous-unité FSH β chez l'anguille européenne (Article 1)

4.1. Séquence partielle de l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité FSH β

La séquence partielle de l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour la sous-unité FSH β a été amplifiée à partir d'une banque d'ADNc d'hypophyse d'anguille Européenne construite dans des vecteurs λ gt 10 (Quérat et al, 1990a et b). Le choix des amorces spécifiques a été réalisé à partir de la séquence d'ADNc codant pour la FSH β de l'anguille japonaise, *Anguilla japonica* (GenBank accession N°. AB016169, Yoshiura et al, 1999). Les paramètres d'amplification sont détaillés dans les résultats (Article 1).

4.2. Séquence complète de l'ADNc codant pour la sous-unité FSH β

La séquence complète de l'ADNc codant pour la sous-unité FSH β a été obtenue à partir des ARN totaux hypophysaires par la méthode RACE (Rapid Amplification of the cDNA Ends).

3'-RACE : Les ADNc sont synthétisés à l'aide d'amorces oligo(dT) modifiées (3'-RACE CDS Primer A) fournies dans le kit SMARTTM RACE cDNA amplification (Clontech Laboratories Inc.), puis utilisés comme substrat pour l'amplification PCR se faisant en présence d'une amorce spécifique (GSP2) et d'une amorce complémentaire de la séquence de l'amorce oligo(dT) contenue dans l'Universal Primer A mix.

5'-RACE : Les ADNc sont synthétisés à l'aide d'amorces oligo(dT) modifiées (5'-RACE CDS Primer) et l'oligo SMART II A relié à la terminaison 5' (Clontech Smart technology). Les ADNc sont utilisés comme substrat pour l'amplification PCR se faisant en présence d'une amorce spécifique (GSP3) et d'une amorce complémentaire de la séquence de l'oligo SMART II contenue dans l'Universal Primer A mix.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume réactionnel final de 50µl à l'aide d'un appareil MWG thermocycler (MWG Biotech).

5. Histologie et hybridation *in situ*

5.1. Coupes de gonades (Article 2)

Les échantillons fixés dans le Bouin aqueux sont déshydratés, inclus dans de la paraffine, coupés au microtome (8µm), réhydratés et colorés selon la méthode de Cleveland – Wolf décrite par Gabe (1968). Les coupes sont observées au microscope DMRB et photographiées avec une caméra DM 300 Logiciel IM version 4.0 (Leica).

5.2. Localisation par hybridation *in situ* des cellules gonadotropes (Article 1)

Les hybridations sont faites sur des coupes transversales (26 µm) d'hypophyses réalisées au cryostat (Leica). La localisation par hybridation *in situ* des cellules gonadotropes est réalisée en utilisant des sondes d'ARN anti-sens de fragments des sous unités FSHβ (426 bp) et LHβ (404 bp) d'anguille. Les sondes sont synthétisées *in vitro* et marquées via le résidu UTP à la digoxigénine (Roche Diagnostics). Les coupes témoins sont réalisées grâce à l'utilisation de sondes d'ARN sens.

Les coupes sont rincées dans une solution saline (2x SSC), déshydratées par des bains successifs dans des solutions à concentration croissante en éthanol et séchées. Les sondes sont diluées à la concentration de 1 µg/ml. Les coupes sont, en alternance, hybridées soit par la

sonde LH β , soit par la sonde FSH β . L'hybridation est réalisée dans une chambre humide durant environ 12 heures à 60°C et arrêtée par des bains successifs dans une solution contenant formamide, SSC et Tween-20 à 60°C. Les coupes sont ensuite rincées dans du MABT (acide maléique, NaCl, Tween-20, pH 7.4).

L'immunodétection des sondes marquées à la digoxigénine se fait après rinçage des coupes dans une solution de MABT contenant du sérum de chèvre (20%) et une solution de blocage (2%) (Roche). Les coupes sont ensuite incubées avec des anticorps anti-digoxigénine conjugués à une phosphatase alcaline. Après rinçage dans du MABT, l'activité de la phosphatase alcaline est visualisée à l'aide d'un substrat, le NBT-BCIP (nitroblue tetrazolium-chromogène et bromochorindolyl phosphate) selon le protocole du fournisseur (Boehringer Mannheim).

Les coupes sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope Leica-DMRB et d'un appareil photo Leica.

6. Dosages

6.1. Dosages des ARN messagers des hormones hypophysaires

6.1.1. Extraction des ARNs totaux

Les hypophyses individuelles sont homogénéisées par sonication dans du Trizol reagent (Invitrogen SARL) (Articles 1 et 2) ou à l'aide du Fast-RNA Pro Green kit (Article 3). Après ajout de chloroforme afin de séparer les phases et centrifugation, la phase aqueuse contenant les ARNs est récupérée. Les ARNs sont précipités par l'ajout d'isopropanol et le stockage 12h à -20 °C. les ARNs sont ensuite rincés par de l'éthanol et remis en suspension dans une solution de stockage, la RNA storage solution (Ambion) et stockés à -80°C.

6.1.2. Dosages de l'expression des hormones hypophysaires par dot blot (Articles 1 et 2)

L'expression de gènes de l'hormone de croissance (GH), et des sous-unités des hormones glycoprotéiques (GP α , LH β , FSH β et TSH β) a été mesurée par dot blot. Cette

méthode permet une quantification relative des ARNm d'un gène cible dans un échantillon tissulaire.

Les ARNs totaux extraits à l'aide de Trizol reagent (Invitrogen SARL) sont dénaturés dans une solution contenant du formamide, du formaldéhyde et du SSC à 65°C et fixés sur une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Après immobilisation des ARNs à 80°C, les membranes sont préparées pour l'hybridation par un bain dans une solution d'hybridation (ULTRAhyb, Ambion Inc.) à 65°C.

Les sondes ARN synthétisées par transcription *in vitro* sont marquées par [α -³²P]UTP et diluées dans la solution d'hybridation (1 x 10⁶ cpm/ml de solution d'hybridation). L'hybridation se fait par mise en contact de la membrane avec la sonde marquée en solution durant une nuit à 65°C. Les membranes sont rincées plusieurs fois dans des solutions astringentes (SSC et SDS), scannées et l'intensité du marquage est quantifiée par un phosphor imager (Bio-Rad Laboratories).

Les sondes sont décrochées des membranes à l'aide du kit Strip-EZTM RNA (Ambion) et hybridées avec une sonde différente suivant le même protocole.

L'expression du gène cible est rapportée à celle d'un gène de référence (ARNr 18s d'anguille) dont l'expression ne varie pas au cours de l'expérience.

6.1.3. Dosage de l'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (Articles 3, 4, données complémentaires)

L'expression de gènes (GP α , LH β , FSH β et activine B) a été mesurée par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Cette méthode permet de visualiser tout le long de la réaction d'amplification la quantité d'acides nucléiques présents dans l'échantillon et donc de quantifier le niveau d'expression (quantité d'ARNm) d'un gène cible dans un échantillon tissulaire.

Les ARNm sont d'abord extraits puis rétro-transcrits (synthèse d'ADNc simple brin). Ensuite, à partir de cet échantillon d'ADNc et grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques, le gène cible est amplifié par PCR. A chaque cycle de la réaction d'amplification, la quantité d'acides nucléiques présents dans l'échantillon est mesurée. Pour cela, un agent intercalant fluorescent (SYBR green) est utilisé ; après liaison avec de l'ADN double brin, il va émettre une lumière fluorescente. Celle-ci est détectée par un spectrofluorimètre inclus dans le thermocycleur (LightCycler, produits et machine Roche Diagnostics).

La concentration en ARNm du gène cible d'un échantillon est inversement proportionnelle au nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre le seuil de détection de fluorescence. L'expression du gène cible est rapportée à celle d'un gène de référence (ARP - phosphoprotéine ribosomiale) dont l'expression ne varie pas au cours de l'expérience.

6.2. Dosages immunologiques

6.2.1. Dosages radioimmunologiques des hormones hypophysaires et des hormones thyroïdiennes (Article 2)

Les contenus hypophysaires et concentrations plasmatiques de l'hormone gonadotrope (LH) ont été mesurés par un dosage radioimmunologique (RIA) de la sous-unité LH β de carpe validé pour son utilisation chez l'anguille (Dufour et al, 1983a).

Les contenus hypophysaires et concentrations plasmatiques de l'hormone de croissance (GH) ont été mesurés par un RIA homologue mis au point au laboratoire (Marchelidon et al, 1996).

Les concentrations plasmatiques en tri-iodothyronine (T3) et thyroxine (T4) ont été dosées par RIA selon le protocole de Leloup et De Luze (1980).

6.2.2. Dosages immunoenzymatiques des hormones stéroïdes et de la vitellogénine (ELISA, EIA) (Article 2)

La concentration plasmatique des stéroïdes sexuels (oestradiol, testostérone, 11-kétotestostérone) est mesurée par dosage immunoenzymatique à l'aide de Kits (Cayman) qui ont été validés pour leur application chez l'anguille.

Les taux plasmatiques de vitellogénine sont mesurés par dosage immunoenzymatique homologue spécifique mis au point au laboratoire (Burzawa-Gérard et al, 1991).

III. RESULTATS

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse seront présentés sous la forme d'articles et de données complémentaires. Après l'obtention par clonage de la séquence de la sous-unité β de la FSH (article 1), nous avons pu analyser l'expression des trois sous-unités des gonadotrophines ($GP\alpha$, $LH\beta$ et $FSH\beta$) au cours du cycle (argenture : article 2 et maturati^on expérimentale : article 1). Nous avons également recherché les facteurs capables de contrôler l'expression des sous-unités des gonadotrophines *in vivo* (articles 1 et 3) et *in vitro* (articles 3 et 4).

1. Article 1 : « Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroids feedback in the European eel ». Schmitz M, Arzua S et al (2005)

1.1. Résumé des résultats

1.1.1. Clonage de la FSH

Afin d'étudier la régulation de l'expression des hormones gonadotrophes, les séquences nucléotidiques des trois sous-unités des gonadotrophines ($GP\alpha$, $LH\beta$ et $FSH\beta$) étaient nécessaires. Les séquences des ADNc codant pour les sous-unités $GP\alpha$ et $LH\beta$ de l'anguille euréennne étant connues, nous avons cloné la sous-unité $FSH\beta$.

Une séquence partielle de l'ADNc de la $FSH\beta$ de l'anguille euréennne a été obtenue à l'aide d'amorces spécifiques choisies à partir de la séquence d'ADNc codant pour la $FSH\beta$ de l'anguille japonaise (GenBank accessi^on N^o. AB016169, Yoshiura et al, 1999). La séquence complète a par la suite été obtenue par les réactions d'amplificati^on 3'- et 5'-RACE.

La séquence complète codant pour l'ADNc de la sous-unité $FSH\beta$ a été soumise à GenBank (accessi^on N^o. AY169722). Elle comporte 1069 nucléotides et comprend une phase ouverte de lecture de 381 bases (figure séquence). Celle-ci code un peptide de 127 acides aminés comprenant un peptide signal de 19 acides aminés et un peptide mature de 108 acides aminés.

De plus, l'analyse par alignement et comparaison de séquences à l'aide du programme Clustal W montre un pourcentage d'identité de 97% entre les séquences FSH β de l'anguille euréenne et de l'anguille japonaise.

1.1.2. Localisation hypothalamique des cellules à LH et à FSH

Une sonde ARN spécifique pour la FSH β de l'anguille euréenne de 426 nucléotides a été obtenue à partir de la séquence clonée. De la même façon, une sonde ARN spécifique pour la LH β d'anguille euréenne de 404 nucléotides a été synthétisée. Celles-ci, capables de se complexer avec les ARNm complémentaires contenus dans les tissus, ont été utilisées pour localiser les lieux d'expression des deux hormones au niveau hypothalamique.

L'étude par hybridation *in situ* sur des coupes adjacentes met en évidence une expression des hormones gonadotropes exclusivement localisée dans la zone prénormale de l'adénohypophyse. L'observation des coupes adjacentes permet également de montrer que la localisation du marquage obtenu avec la sonde FSH β diffère de celle obtenue avec la sonde LH β . Ces résultats indiquent que les hormones gonadotropes, LH et FSH, sont exprimées par des cellules hypothalamiques différentes chez l'anguille euréenne.

1.1.3. Variations de l'expression des sous-unités des hormones gonadotropes au cours de la maturation expérimentale

a. Chez la femelle

La maturation expérimentale obtenue par des traitements gonadotropes (extraits hypothalamiques de carpe) induit chez les animaux une augmentation progressive du rapport gonadostomatique (RGS ou Gonadostomatic Index, GSI). Les anguilles au stade argenté ont un RGS moyen de $1.8 \pm 0.1\%$. Chez les anguilles traitées pendant 16 semaines, le RGS atteint $33 \pm 3\%$.

Les profils d'expression des trois sous-unités des hormones gonadotropes ont été suivis au cours de la maturation expérimentale par dot blot. Les sous-unités LH β et GP α connaissent des profils similaires, avec une forte augmentation des messagers au cours de la maturation. Les variations les plus importantes sont observées pour la sous-unité LH β , avec des taux hypothalamiques en ARNm chez les animaux traités pendant 16 semaines, 120 fois supérieur à ceux observés chez les anguilles témoins ($P < 0.001$). En ce qui concerne la sous-unité GP α ,

l'expressi`n des messagers est 8 fois plus imp`rtante chez les animaux traités pendant 16 semaines que chez les tém`ins ($P < 0.001$).

La s`us-unité FSH β réagit différemment aux traitements g`nad`tr`pes : après 16 semaines de traitement, les taux d'ARNm `nt significativement diminué c`mparés aux tém`ins ($P < 0.001$).

b. Chez le mâle (d`nnées c`mplémentaires)

Une expérience de maturati`n expérimentale a également été réalisée chez le mâle par des traitements à la hCG. Chez les mâles, c`mme chez les femelles, les traitements g`nad`tr`pes induisent un dével`ppement des g`nades : le RGS m`yen chez les anguilles mâles argentées est de 0.18 ± 0.02 %. Après 8 semaines de traitement, le RGS m`yen atteint 5.3 ± 0.4 % (Figure 9A).

Les pr`fils d'expressi`n des tr`is s`us-unités des g`nad`tr`pines `nt été suivis au c`urs de la maturati`n expérimentale par d`tbl`t. Les traitements g`nad`tr`pes induisent de f`rtes augmentati`ns, significatives dès 4 semaines de traitements ($P < 0.01$), des taux d'ARNm c`dant p`ur la s`us-unité LH β . Des taux qui atteignent des niveaux 37 fois supérieurs chez les animaux traités pendant 8 semaines c`mparés aux tém`ins ($P < 0.001$) (Figure 9B).

C`ncernant la s`us-unité GP α , une augmentati`n significative des taux hyp`physaires en ARNm est également `bservée au c`urs de la maturati`n expérimentale. Cette augmentati`n, significative dès 4 semaines de traitements ($P < 0.05$), atteint des taux 13 fois plus imp`rtants chez les mâles traités pendant 8 semaines en c`mparais`n avec les tém`ins ($P < 0.001$) (Figure 9C).

En revanche, les taux d'ARNm c`dant p`ur la s`us-unité FSH β m`ntrent des tendances à la baisse. Cette baisse est significative après 8 semaines de traitements ($x 0.4$ c`mparé aux tém`ins, $P < 0.05$) (Figure 9D).

1.1.4. Effets de traitements in viv` par les stér`ides sexuels sur l'expressi`n des g`nad`tr`pines

L'expressi`n des s`us-unités FSH β , LH β et GP α des g`nad`tr`pines a été mesurée par d`tbl`t chez des anguilles argentées ayant reçu des traitements pendant 7 semaines par l`estradi`l et la test`stér`ne.

Chez les anguilles traitées à l'estradiol, une augmentation significative de l'expression des sous-unités LH β (x 6.5 par rapport aux témoins, $P < 0.01$) et GP α (x 2.4 par rapport aux témoins, $P < 0.001$) est observée. En ce qui concerne la sous-unité FSH β , aucun changement significatif n'a été montré suite aux traitements par l'estradiol.

Contrairement à ce qui a été observé suite aux traitements par l'estradiol, chez les anguilles traitées par la testostérone, il n'y a pas de variation significative des sous-unités LH β et GP α par rapport aux témoins. En revanche, une diminution significative des taux d'ARNm correspondant à la sous-unité FSH β a été observée après traitement par la testostérone (x 0.3 par rapport aux témoins, $P < 0.001$).

Ces résultats montrent que les stéroïdes sexuels sont capables d'exercer un contrôle sur l'expression des glandes trépanées et permettent de mettre en évidence une régulation différentielle des différentes sous-unités des glandes trépanées.

1.2. Texte de l'article 1 : « Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroids feedback in the European eel ». Schmitz M, Aréau S et al (2005) *Neuroendocrinology* 81 : 107-119.

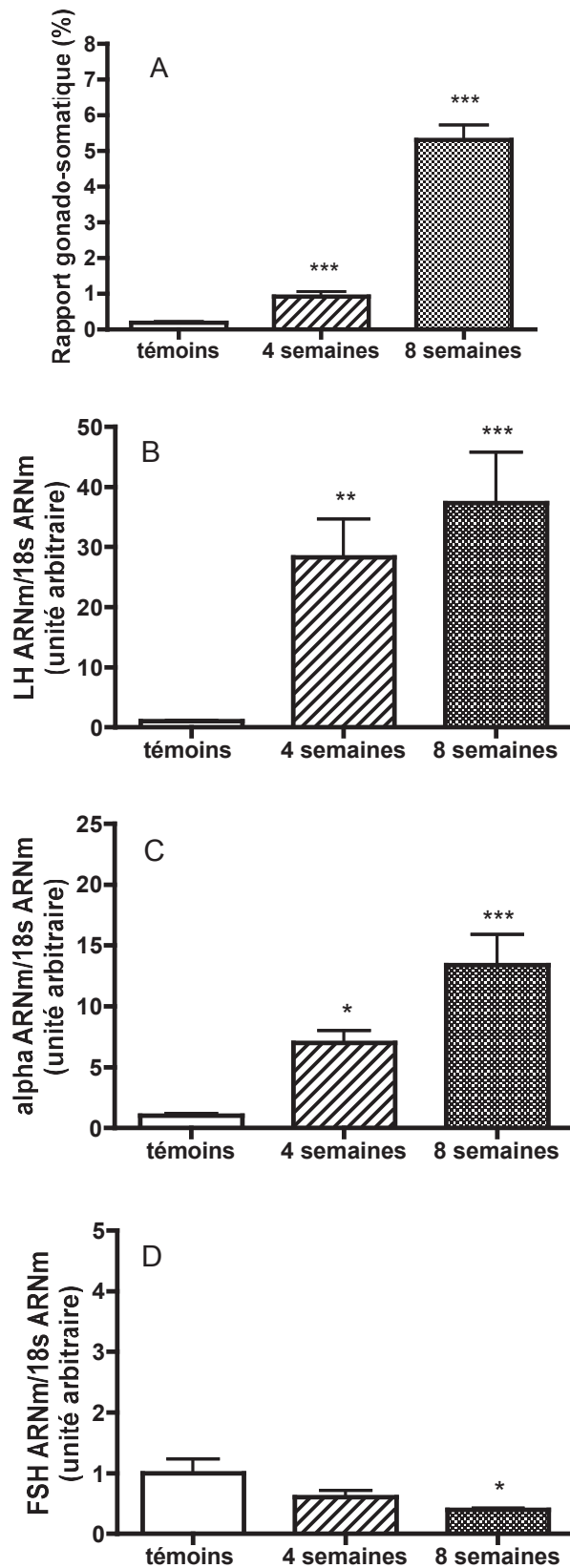


Figure 9 : Effets des traitements gonadotropes sur le développement gonadique et l'expression des sous-unités des gonadotropines chez l'anguille mâle. A) Rapport gonadosomatique; niveaux hypophysaires en ARNm pour B) LH β , C) GP α , D) FSH β . L'expression des ARNm a été mesurée par dot blot et les résultats normalisés à l'aide de l'ARN 18s. Les moyennes sont données \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparé aux témoins, ANOVA.

2. Article 2 : « Endocrine evidence that silvering a secondary metamorphosis in the eel is a pubertal rather than a metamorphic event ». Aroua S et al (2005)

2.1. Résumé des résultats

L'argenteure, aussi appelée métamorphose secondaire, est un long processus où d'importants changements se produisent chez l'anguille. Afin de décrypter les mécanismes hormonaux permettant de contrôler ces modifications, nous avons suivi l'activité des deux axes principalement connus pour être impliqués l'un dans la métamorphose, l'axe thyroïdienne, et l'autre dans la puberté, l'axe gonadotrope. Différents paramètres anatomiques, décrits comme caractéristiques de l'argenteure, ont également été relevés au cours du processus (Marchelidon et al, 1999 ; Durif et al, 2005).

L'étude a porté sur trois séries d'échantillonnages d'anguilles.

2.1.1. Echantillonnage 1

Dans l'échantillonnage 1, les anguilles ont été regroupées en fonction de leur RGS en trois stades en accord avec la classification proposée par Durif et al (2005) : stade jaune, RGS < 0.4%, stade intermédiaire, $0.4\% \leq \text{RGS} < 1.2\%$, stade argenté $1.2\% \leq \text{RGS}$. Les paramètres anatomiques (poids, taille, index oculaire, index digesto-somatique) ont été mesurés. Les contenus hypophysaires en hormones lutéinisante (LH) et de croissance (GH) et les taux plasmatiques en hormones thyroïdiennes (T3 et T4) ont été dosés par RIA et comparés entre les différents stades.

Des variations significatives des paramètres anatomiques ont été observées entre les stades jaunes et argentés avec une augmentation de l'index oculaire (OI) ($\times 2$, $P < 0.001$) et une réduction de l'index digesto-somatique (DSI) ($\times 0.34$, $P < 0.001$). Des variations significatives ont également été observées entre les stades jaune et argenté au niveau des contenus hypophysaires en hormones. Une forte augmentation des contenus hypophysaires en hormone LH ($\times 51$ comparé au stade jaune, $P < 0.001$) a été mesurée au stade argenté ; en revanche, les contenus hypophysaires en hormone GH sont significativement moins importants chez les anguilles argentées que chez les anguilles jaunes ($\times 0.6$, $P < 0.001$). Concernant les taux plasmatiques en hormones thyroïdiennes, aucune variation significative n'a été observée au cours du processus d'argenteure.

2.1.2. Echantillonnage 2

Pour nous permettre d'avoir une vision plus fine des modifications hormonales intervenant au cours de l'argenteure, les stades intermédiaires des échantillons 2 et 3 ont été subdivisés en 3 groupes conduisant à la classification suivante :

Stade jaune : groupe A = $RGS < 0.4\%$

Stade intermédiaire : groupe B = $0.4\% \leq RGS < 0.6\%$

groupe C = $0.6\% \leq RGS < 0.8\%$

groupe D = $0.8 \leq RGS < 1.2\%$

Stade argenté : groupe E = $1.2\% \leq RGS$.

Les paramètres anatomiques ont été mesurés, et les contenus hypophysaires et les taux plasmatiques en hormones LH et GH ont été dosés par RIA.

Comme pour l'échantillonnage 1, des variations progressives et importantes en fin d'argenteure des paramètres anatomiques (IO et DSI) ont été observées au cours de la transition jaune – argenté ; IO augmentant de manière significative ($\times 2.1$, $P < 0.001$) et le DSI marquant une forte baisse ($\times 0.4$, $P < 0.001$) au stade argenté comparé au stade jaune.

Concernant les contenus hypophysaires en hormones, la LH ne montre pas de variations significatives entre les stades jaune et intermédiaires, puis une forte augmentation de la LH est observée en fin d'argenteure (groupe E : $\times 51$ comparé au stade jaune groupe A, $P < 0.001$). En revanche, aucune variation des contenus hypophysaires en GH n'est observée au cours de l'argenteure. Aucune variation significative n'a été observée au cours du processus d'argenteure pour les taux plasmatiques en GH ou LH.

2.1.3. Echantillonnage 3

Les paramètres anatomiques ont été mesurés. L'expression des hormones hypophysaires (LH β , FSH β , GP α , GH et TSH β) a été mesurée par dot blot et les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels (E₂, T, 11-KT) et en vitellogénine ont été mesurées par des dosages immunoenzymatiques.

Comme dans les autres échantillonnages, l'IO a augmenté (x 2.9 groupe E comparé au groupe A, $P < 0.001$) alors que le DSI a baissé (x 0.05 groupe E comparé au groupe A, $P < 0.01$) au cours de l'argenture.

Concernant les hormones hypophysaires, seules les sous-unités des gonadotropines (LH β , FSH β et GP α) montrent des variations significatives de leur expression au cours du processus d'argenture ; avec une augmentation progressive des taux d'ARNm de la sous-unité FSH β entre les groupes A et D, alors que l'expression des autres hormones étudiées (GH, TSH β , LH β et GP α) reste basse. L'expression des sous-unités LH β et GP α augmente de manière importante en fin d'argenture (LH β : x 9 groupe E comparé au groupe A, $P < 0.05$; GP α : x 2.2 groupe E comparé au groupe A, $P < 0.001$).

Les concentrations plasmatiques en hormones stéroïdes (E₂, T, 11-KT) et en vitellogénine (Vg) montrent également des variations au cours de l'argenture. L'E₂ connaît une première élévation des taux plasmatiques entre le stade jaune et le stade intermédiaire (x 5.1 groupe C comparé au groupe A, $P < 0.05$), puis une seconde en fin d'argenture au stade argenté (x 9.2 groupe E comparé au groupe A, $P < 0.001$). Concernant les autres hormones dosées (T, 11-KT et Vg), les augmentations significatives de leurs concentrations plasmatiques sont observées seulement en fin d'argenture (groupe E).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'axe gonadotrope est activé au cours du processus d'argenture avec des variations observées au niveau hypophysaire (augmentation de l'expression des sous-unités des gonadotropines) et au niveau gonadique (augmentation de la production des stéroïdes sexuels) alors que les autres axes (somatotrope et thyroïdienne) montrent peu ou pas de variations.

2.1.4. Expérimentation *in vivo*

Pour vérifier l'implication de l'axe gonadotrope ou de l'axe thyroïdienne dans le contrôle des changements « métamorphiques » de l'argenture, des anguilles jaunes ont été traitées par des stéroïdes sexuels (E₂ et T) ou des hormones thyroïdiennes (T₄) et les paramètres biométriques caractéristiques de l'argenture mesurés.

La testostérone a été capable d'induire une augmentation de l'index oculaire (IO) et une régression du tractus digestif (DSI), ce qui n'a pas été le cas avec les traitements par la T₄.

Ces résultats confortent l'hypothèse de l'implication de l'axe gonadotrope dans le contrôle de la métamorphose secondaire chez l'anguille

2.2. Texte de l'article 2 : « Endocrine evidence that silvering a secondary metamorphosis in the eel is a pubertal rather than a metamorphic event ». Aroua S et al (2005) Neuroendocrinology 82 : 221-232.

3. Article 3 : « Development of real time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids ». Aroua S et al (2007)

3.1. Résumé des résultats

Afin d'améliorer les techniques de dosages et d'augmenter la sensibilité de détection des ARNm, nous avons développé les outils nécessaires au dosage des trois sous-unités des gonadotropines, LH β , FSH β et GP α par PCR quantitative en temps réel.

Ces outils ont été utilisés pour analyser les effets induits par des traitements stéroïdiens (E₂, T, DHT) *in vivo* chez des anguilles femelles argentées. Ils ont également été utilisés lors d'expérimentations *in vitro* sur des cultures primaires de cellules hypophysaires, pour caractériser les effets directs hypophysaires des stéroïdes sexuels.

3.1.1. Effets des stéroïdes *in vivo* sur l'expression des sous-unités des gonadotropines

Dans les expérimentations *in vivo*, comme dans nos travaux précédents, un effet stimulateur de l'expression de LH β a été observé suite aux traitements par E₂ (x 7.6 comparé aux témoins, $P < 0.05$). En revanche, E₂ n'a pas induit de variations significatives de l'expression des sous-unités GP α et FSH β . Les traitements *in vivo* par les androgènes (T ou DHT) n'ont pas eu d'effets significatifs sur les taux d'ARNm codant pour les sous-unités des gonadotropines.

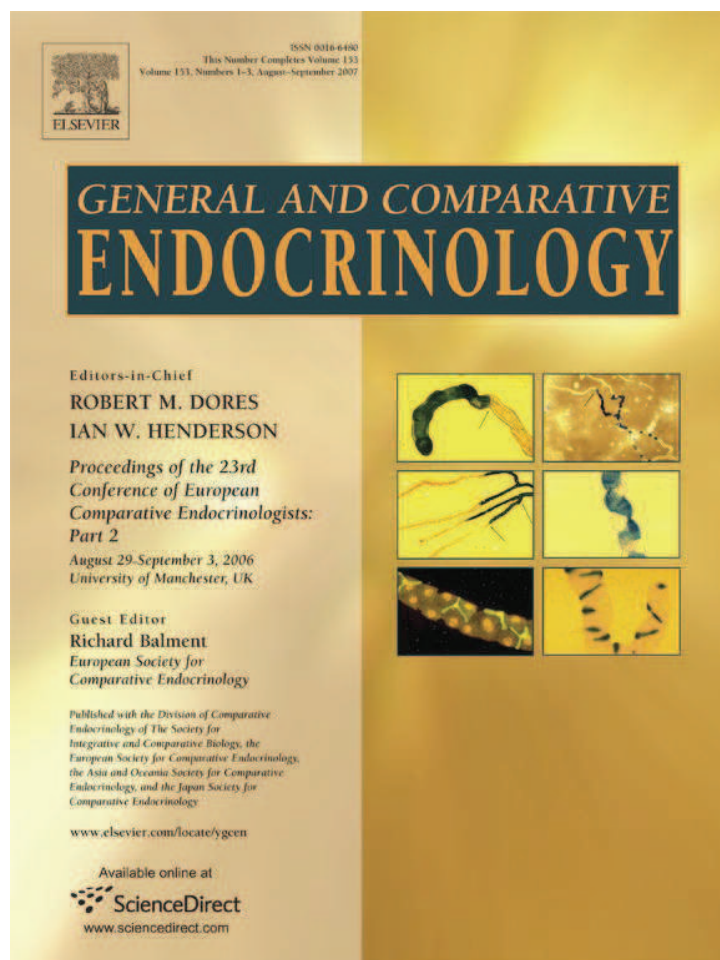
3.1.2. Effets des stéroïdes *in vitro* sur l'expression des sous-unités des gonadotropines

Les expérimentations *in vitro* montrent des résultats différents de ceux obtenus *in vivo* : les traitements des cellules par E₂ n'ont aucun effet sur l'expression de LH β . Ils n'induisent pas non plus de variations des ARNm de GP α ; en revanche, *in vitro*, E₂ stimule l'expression de la sous-unité FSH β (x 2.7 comparé aux témoins, $P < 0.01$). Concernant les androgènes (T ou DHT), alors qu'ils n'induisent aucune variation significative des sous-unités GP α et FSH β ; de fortes stimulations de l'expression de LH β sont observées après des traitements par T (x 9.2 comparé aux témoins, $P < 0.001$) et par DHT (x 9.3 comparé aux témoins, $P < 0.001$).

Les résultats différents obtenus par les expérimentations *in vivo* et *in vitro* montrent que les stéroïdes sexuels exercent leurs rétrocontrôles sur l'expression des gonadotropines via des actions à différents niveaux de l'axe gonadotrope : directement au niveau hypophysaire ou indirectement par des actions sur le contrôle cérébral.

3.2. Texte de l'article 3 : « Development of real time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids ». Aroua S et al (2007) *General and Comparative Endocrinology* 153 : 333-343.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



General and Comparative Endocrinology 153 (2007) 333–343

GENERAL AND COMPARATIVE
ENDOCRINOLOGY

www.elsevier.com/locate/ygcen

Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids

Salima Aroua^a, Finn-Arne Weltzien^{a,b}, Nadine Le Belle^a, Sylvie Dufour^{a,*}^a USM 0401, UMR 5178 CNRS/MNHNI/Université Pierre et Marie Curie, Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes, Département des Milieux et Peuplements Aquatiques, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75231 Paris Cedex 05, France^b Department of Molecular Biosciences -Programme for Physiology, University of Oslo, 0316 Oslo, Norway

Received 18 October 2006; revised 20 February 2007; accepted 24 February 2007

Available online 2 March 2007

Abstract

Gonadotropins, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), are key factors in the brain-pituitary-gonad axis and understanding their regulation remains essential for future management of eel reproduction. In this regard, we developed quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) assays for the expression of European eel LH β , FSH β and GP α subunits, using the Light Cycler system. The qRT-PCR was adapted to permit detection of the three gonadotropin subunit mRNAs in individual pituitaries and in dispersed pituitary cells. The validated assays were applied to investigate the effects of sex steroids (estrogens and androgens) on gonadotropin subunit expression, *in vivo* in steroid-injected eels, and *in vitro* by steroid treatments of primary cultures of eel pituitary cells.

In vivo, a stimulation of LH β mRNA was observed after estradiol (E2) treatments, while testosterone (T) or the non-aromatizable androgen dihydrotestosterone (DHT) had no effect. Concerning FSH β expression, slight but non-significant decreases were observed after both E2 and androgen treatments. Different results were obtained *in vitro*: E2 induced an increase in FSH β mRNA levels but had no effect on LH β expression. In contrast, androgens (T and DHT) stimulated LH β expression while no significant variation was observed on FSH β mRNA levels following androgen treatment. Concerning the GP α mRNA, no significant effect of sexual steroids was observed *in vivo* or *in vitro*. This demonstrated specific direct actions of steroids on gonadotropin subunit expression. The differences observed between *in vivo* and *in vitro* experiments may be explained by the involvement of cerebral control, including GnRH and dopamine neurons, and their specific regulation by sex steroids. The data indicate that sex steroid feedbacks on gonadotropins are exerted via multiple pathways, indirectly at the brain level and directly on pituitary gonadotrope cells.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Androgens; Estradiol; FSH; LH; Pituitary cell; Steroid feedback; Teleost

1. Introduction

In mammals, control of reproduction by the brain-pituitary-gonad (BPG) axis is well established. A hypothalamic decapeptide, the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) acts on the pituitary by inducing synthesis and release of two gonadotropins: luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH). LH and FSH are

glycoprotein hormones constituting of two subunits, α (GP α) which is common for both hormones, and β (FSH β or LH β) which is hormone-specific and thus conferring biological activity to each hormone. In mammals, FSH and LH are secreted by the same pituitary cells, and respond to a differential frequency of the pulsatile secretion of GnRH (for review: Gharib et al., 1990). The gonadotropins act on the gonads by inducing development and maturation of gametes and production of sexual steroids. The sexual steroids regulate cerebral and pituitary factors through differential feedback mechanisms.

* Corresponding author. Fax: +33 1 40 79 36 18.

E-mail address: dufour@mnhn.fr (S. Dufour).

In teleosts, the system remains similar although some differences are apparent. First, various studies have shown, using immunohistochemistry and *in situ* hybridization, that LH β and FSH β are expressed by separate pituitary cells (salmonids: Nozaki et al., 1990; platyfish: Magliulo-Cepriano et al., 1994; tuna: Kagawa et al., 1998; tilapia: Melamed et al., 1998; gilthead sea bream: Garcia Ayala et al., 2003; Atlantic halibut: Weltzien et al., 2004; European eel: Schmitz et al., 2005). Second, in addition to the GnRH stimulatory action at the pituitary level, dopamine (DA) may exert an inhibitory effect on the pituitary gonadotropes. The effect of these two neurohormones, GnRH and DA, together regulate the synthesis and release of the two gonadotropins and thus participates in the control of ovulation in sexually mature teleosts from various species (for review: Peter et al., 1986). Studies from our group have also shown that such a dual control, stimulatory by GnRH and inhibitory by DA, would also be involved in the regulation of gonadotropins at an earlier stage of gametogenesis, in the prepubertal eel (for review: Dufour et al., 2003, 2005; Vidal et al., 2004; Weltzien et al., 2006).

Similar to the situation in mammals, gonadotropins induce gonadal maturation and sex steroid synthesis also in teleosts. In addition to their local effects in the developing gonads, the sex steroids will, like in mammals exert feedback regulations at the brain and pituitary level. For instance, various studies have demonstrated negative feedback of sex steroids on LH synthesis and release in teleosts, either following gonadectomy and/or steroid treatments (salmonids: Billard et al., 1977; Larsen and Swanson, 1997; African catfish: De Leeuw et al., 1986; goldfish: Kobayashi and Stacey, 1990). However, there also exist data indicating stimulatory effects of sex steroids on LH, mostly in juveniles but also in adult fish (rainbow trout: Crim and Evans, 1979; European eel: Dufour et al., 1983; Quéirat et al., 1991; coho salmon: Dickey and Swanson, 1998).

Concerning steroid feedback on FSH, the situation in teleosts is less clear as available data are scarce. An *in vivo* negative feedback was described in female and male maturing coho salmon after estradiol (E2) treatment (Dickey and Swanson, 1998) and in juvenile mixed sex goldfish after testosterone (T) treatment (Kobayashi et al., 2000). In contrast, *in vivo* E2 treatment induced an increase in FSH β mRNA levels in maturing and mature goldfish (Huggard-Nelson et al., 2002).

Considering the large variability of responses depending on the developmental stage and on fish species, the regulatory mechanisms of gonadotropin expression may not be generalized to all teleosts. However, how pituitary gonadotropins are regulated is a key point to control fish reproduction. This is particularly important in the case of eel, bearing in mind the dramatic decline of eel populations (Stone, 2003). Until now, some aspects of the eel life cycle, such as sexual maturation and spawning, are still unknown under natural conditions. Indeed, if the reproductive migration is prevented, a blockade of reproductive

function occurs, and eels remain at a prepubertal stage. This blockade is due to a deficient production of pituitary gonadotropins (for review: Dufour et al., 2003, 2005). Until now, investigations on artificial eel reproduction are still not conclusive. Sensitive molecular tools are strongly required to further improve our knowledge concerning eel gonadotropin regulation.

In the present study, we developed quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) assays for European eel LH β , FSH β and GP α , in order to evaluate gonadotropin subunit expression in eel individual pituitaries as well as in primary cultures of eel pituitary cells. We applied the developed assays to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids on the mRNA expression of gonadotropin subunits in the prepubertal female European eel.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female European eel (*Anguilla anguilla*) were netted by professional fishermen during their downstream migration in the Loire river at their prepubertal silver stage. The eels were transferred to the laboratory (MNHN, Paris, France) and kept in running aerated freshwater tanks under natural photoperiod and temperature (15 ± 2 °C). Because eels undergo a natural starvation at the silver stage, they were not fed. Animal manipulations were performed according to French regulations and the European convention on animal experimentation for scientific research.

2.2. Hormones

For the *in vivo* and *in vitro* experiments, estradiol (E2), testosterone (T), or the non-aromatizable androgen dihydrotestosterone (DHT) were used (Sigma–Aldrich Corp., Saint Louis, MO).

2.3. *In vivo* steroid treatments and sampling procedure

Thirty two female silver eels (body weight (BW): 344 ± 57 g) were divided into four experimental groups ($n = 8$ eels/group; 4 eels per 100 l tank). Eels received one injection per week of 2 μ g steroid/g BW suspended in 0.15 M NaCl or vehicle alone (control). Weekly injections for 8 weeks resulted in stable and physiologically relevant plasma concentrations of the injected steroid (from 10 to 80 ng/ml) as previously shown in eel studies (Weltzien et al., 2006).

Sample collections were performed one week after the last injection. Eels were killed by decapitation. The pituitary glands were quickly removed and stored in 0.5 ml RNA later (Ambion Inc, Huntingdon, UK) at -20 °C until extraction. Ovaries were dissected and weighed for gonadosomatic index determination ($GSI = (\text{gonad weight}/\text{BW}) \times 100$).

2.4. Primary culture of eel pituitary cells and *in vitro* steroid treatments

Dispersion and primary culture of pituitary cells were performed using an enzymatic and mechanical method as described by Montero et al. (1996). Briefly, pituitaries were cut into 1-mm slices and incubated at 25 °C in a solution of porcine type II trypsin (Sigma). After 1 h, the trypsin solution was replaced by a solution of DNase (Sigma) and soya bean trypsin inhibitor (Sigma) for 10 min. Pituitary slices were then washed with calcium free phosphate buffer (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) and mechanically dispersed by repeated passages through a plastic transfer pipette (Falcon, Dutscher, Brumath, France). After estimating the number of viable cells by Trypan Blue coloration (Sigma), cells were plated on

96-well plates pre-coated with poly-lysine (Sigma). Cultures were performed in serum-free culture medium (CM: Medium 199 with Earle's salt, sodium bicarbonate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 250 ng/ml fungizone (Gibco)) at 18 °C under 3% CO₂ and saturated humidity.

A preliminary experiment was performed to test and optimize the cell density for qRT-PCR detection of the three gonadotropin subunits. Cells were plated at different densities: 20,000, 40,000, 60,000 and 80,000 cells/well. After this preliminary experiment, we chose to work at a density of 50,000 cells per well with six replicates for each treatment. To allow cell attachment, the start of treatment began 24 h after the start of cultures (Day 0). Steroid stock solutions (10⁻³ M) were prepared in ethanol and stored at 4 °C. The culture medium was changed and steroids added to the cells on Day 1, Day 4, and Day 7. Steroid stock solutions were diluted in culture medium just before their addition to culture wells. Final steroid concentration was 10⁻⁷ M corresponding to 27 ng/ml for E2 and 29 ng/ml for T and DHT. Ethanol final concentration in the culture wells never exceeded 0.01%. Control wells were treated with the similar final concentration of ethanol. Cultures were stopped on Day 9.

2.5. RNA extraction and cDNA synthesis for the *in vivo* experiment

Total RNA was extracted from individual pituitaries using the Fast-RNA Pro Green kit (Qbiogene, Illkirch, France) after homogenisation using a FastPrep instrument (Qbiogene). All samples were submitted to a deoxyribonuclease I treatment following extraction (DNA-free, Ambion, Inc.). First strand cDNA was synthesized using 2 µg of total RNA as template in 50 µl reactions. The RNA was preincubated with 0.5 µg random hexamer primers (Promega Corp., Charbonnières, France), before the RT reaction was set up using 100 nmol deoxyribonucleotide triphosphate, 56 U ribonuclease inhibitor, and 400 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (all from Promega Corp.). cDNAs were stored at -20 °C until analyses.

2.6. Cell lysis and cDNA synthesis for the *in vitro* experiment

Total RNA was directly extracted in each culture well using the Cell-to-cDNA™II kit (Ambion Inc.) according to the manufacturer's recommendations. Cells were washed with sterile PBS (Gibco) and lysed with Cell Lysis II buffer (80 µl/well). Then, the lysates were submitted to a deoxyribonuclease I treatment (Ambion Inc.).

cDNA synthesis was performed in a 20 µl final reaction volume. Five microliters of the cell lysate was preincubated with 100 ng of random primers and 10 mmol deoxynucleotide triphosphate (Invitrogen, Illkirch, France). Then the RT reaction was set up using 0.1 M DTT, 40 U ribonuclease inhibitor, and 200 U Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen).

2.7. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Primers and reference genes: We used acidic ribosomal phosphoprotein P0 (ARP), β-actin and cytochrome b (cytb) as reference genes in the qRT-PCR analyses. Gene specific primers were designed (for primer sequence, see Table 1) using the Primer3 Software (Whitehead Institute/Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA), and was based on the nucleotide sequences of the European eel FSHβ cDNA (GenBank Accession No. AY169722, Schmitz et al., 2005), LHβ cDNA (GenBank Accession No. X61039, Quérat et al., 1990b), GP α cDNA (GenBank Accession No. X61038, Quérat et al., 1990a), ARP cDNA (GenBank Accession No. AY763793, Weltzien et al., 2005), β-actin cDNA (GenBank Accession No. DQ493907, Pierron et al., unpublished) and cytb cDNA (GenBank Accession No. AF006714, Lin et al., 2001). For comparison of expression levels, we chose growth hormone (GH, GenBank Accession No. AY616666, Gong et al., 2002) which is known to be largely expressed in the eel pituitary. One primer of each pair was designed in a cDNA exon-exon border to avoid genomic DNA amplification. The primers were purchased from MWG-Biotech AG (Edersburg, Germany).

SYBR Green assay: The quantitative assays of eel gonadotropin subunit expression were set up using the Light Cycler system with SYBR Green I sequence-unspecific detection (Roche, Meylan, France). The PCRs were prepared with 4 µl of diluted cDNA template, forward and reverse primers (7.5 pmol each), and SYBR Green Master Mix (3 µl) at a final volume of 15 µl. To optimize the reaction, different annealing temperatures were tested according to the *T_m* of each primer pair. After careful testing, we chose to work at the following conditions for all assays: an initial activation of *Taq* polymerase at 95 °C for 10 min, followed by 41 cycles of PCR: 95 °C for 15 s, 60 °C for 5 s and 72 °C for 10 s.

For the *in vivo* experiments. Serial dilutions of a pituitary cDNA pool made from several samples were run in duplicate for the target (LHβ, FSHβ and GPα) and the reference (ARP) genes, to assess PCR efficiency and to be used as the standard curve for each gene. Then, PCRs for target and reference genes expression in unknown samples were run in duplicate from the same cDNA dilution taken from the same RT reaction. The pituitary cDNA pool used for the standard curve was also included in each run as a calibrator.

For the *in vitro* experiments. Serial dilutions of a cDNA pool made from several culture wells were run in duplicate for the target (LHβ, FSHβ and GPα) and the reference (ARP, β-actin, cytb) genes to assess PCR efficiency and to be used as the standard curve for each gene. Then, PCRs for target and reference genes expression in unknown samples were run in duplicate from the same cDNA dilution taken from the same RT reaction. The cell culture cDNA pool used for the standard curve was also included in each run as a calibrator.

Each PCR run contained a non-template control (cDNA was substituted by water) for each primer pair to confirm that reagents were not contaminated, and a calibrator to permit the adjustment from assay to assay variations. Intra assay variation was 1–2% and inter assay about 12%.

The specificity of each reaction was assessed by melting curve analysis to ensure the presence of only one product, by gel electrophoresis to verify the molecular weight of the product, and by sequencing. Relative expression levels were calculated by: $\text{relative expression} = E_{\text{target}}^{\Delta C_p(\text{calibrator}-\text{sample})} \times E_{\text{reference}}^{\Delta C_p(\text{sample}-\text{calibrator})}$, where *C_p* is the crossing point (cycle number at which fluorescence increases above a background threshold level) and *E* is the efficiency of the PCR amplification. For further details, see Weltzien et al., 2005.

2.8. Statistical analysis

In vivo and *in vitro* experiments have been replicated twice. Results are from a representative experiment. Data are presented as means ± SEM. Statistical analyses were performed using Instat 3.0b (GraphPad, Inc., San Diego, CA). Comparison of means was performed with a one-way ANOVA followed by the Dunnett comparison post-test. Data were log-transformed to meet homogeneity of variances, when necessary. The level of significance was set to 0.05.

3. Results

3.1. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropin subunits

In the present work, we developed and validated qRT-PCR assays for relative quantification of European eel gonadotropin subunits: LHβ, FSHβ and GPα. As reference genes, we tested ARP, β-actin and cytb.

Analysis of serial dilutions of a pituitary cDNA pool assayed using different annealing temperatures for each primer pair permitted the optimization of the qRT-PCR conditions in relation to specificity and efficiency. For each gene, an optimal efficiency (about 100%) was reached. We

Table 1
Primer sequences for each primer pair

	Primer sequence	Amplicon size
LH β	fw TCA CCT CCT TGT TTC TGC TG rv TAG CTT GGG TCC TTG GTG ATG	149 bp
FSH β	fw TCT CGC CAA CAT CTC CAT C rv AGA ATC CTG GGT GAA GCA CA	100 bp
GP α	fw TGC CGA CTC CAG GAG AAT AA rv TGT TAT CCA GCC TTG TCA CC	184 bp
GH	fw AAA TCG GAT GGG TAC TTG CTG rv ACC GTC ACC TAC ATC CTT CAT	183 bp
ARP	fw GTG CCA GCT CAG AAC ACT G rv ACA TCG CTC AAG ACT TCA ATG G	107 bp
β -Actin	fw CAG CCT TCC TTC CTG GGT rv AGT ATT TGC GCT CGG GTG	226 bp
cytb	fw CAC AAA TCC TTA CAG GAC TAT TCC TAG rv GTA AAG GTA TGA GCC GTA GTA AAG	200 bp

Gene-specific primers were designed for amplification and quantification of messenger RNA of various European eel pituitary hormones by qRT-PCR using ARP, β -actin or cytb as reference genes. LH β , luteinizing hormone β subunit; FSH β , follicle-stimulating hormone β subunit; GP α , glycoprotein alpha subunit; GH, growth hormone; ARP, acidic ribosomal phosphoprotein; cytb, cytochrome b.

could perform the annealing at 60 °C for all genes, a temperature giving high efficiency in each reaction and permitting to work under similar conditions for each gene. Efficiencies were similar in *in vivo* experiments as in *in vitro* experiments and values were comprised between 90.5 and 104%.

In each experiment, the melting curve analyses indicated only one peak. For each primer pair, the gel electrophoresis performed revealed one band at the expected molecular size, and sequencing of the amplified product finally assessed the specificity of each assay.

The developed qRT-PCR assays permit the detection of the three gonadotropin subunits in individual pituitaries. As cDNA samples were the same and PCR efficiencies were optimal for all genes, average Cp values provide some indications on the comparative gene expression levels. In the *in vivo* experiment, average Cp values for LH β and FSH β were, in control samples, in the same range (mean of LH β Cp = 28.8; mean of FSH β Cp = 25.3) as compared to mean of GH Cp (17.9). The mean Cp for GP α appeared earlier (21.7) compared to LH β and FSH β . The mean Cp value for the reference gene ARP was 24.6.

The preliminary *in vitro* experiment allowed us to select a cell density compatible with the qRT-PCR. At a cell density of 20,000 cells/well, gonadotropin subunit mRNAs were at the limit of detection, while at 40,000, 60,000 and 80,000 cells/well, subunit expression was clearly detected with a low inter-well variability. The density of 50,000 cells/well was chosen for further experiments. *In vitro*, the mean Cp for LH β and FSH β in control wells were in a similar range (29.4 for LH β , and 32.7 for FSH β), and appeared lower for GP α (22.2) or GH (20.7). The mean Cp value for the refer-

ence genes ARP, β -actin and cytb were, respectively, 23.4, 26.4 and 25.6.

3.2. Selection of a reference gene

In the *in vivo* experiments, ARP was measured in each sample and the means of estimated concentration for each group compared. No significant variations in ARP were observed between groups. In the *in vitro* experiments, ARP was firstly used as reference gene. After analysis, a slight increase in ARP expression (from x1.4 NS to x2.2 $P < 0.001$, as compared to controls, according to the experiments) was observed after steroid treatments. These results let us to look for other reference genes, the β -actin and cytb. In these two cases, stimulating effect of steroids were also observed with increases varying from x1.5 NS to x5.4 $P < 0.001$ for β -actin and from x2.1 NS to x6.7 $P < 0.001$ for cytb. We chose to keep ARP as a reference gene for the following experiments.

3.3. *In vivo* effects of sex steroids on gonadotropin subunit mRNA expression

In vivo steroid treatment for 8 weeks did not induce any significant gonadal development, as assessed by GSI. No significant variation of the GSI was observed between groups: Control $1.41 \pm 0.09\%$, E2 treated group $1.54 \pm 0.22\%$, T treated group $1.46 \pm 0.24\%$, DHT treated group $1.66 \pm 0.18\%$. Chronic *in vivo* treatment with sex steroids resulted in differential effects on the expression of the three gonadotropin subunits in female silver eel.

The relative expression of LH β mRNA was strongly stimulated by E2 treatment ($\times 7.6$ as compared to controls, $P < 0.05$). In contrast, no significant effects on LH β mRNA

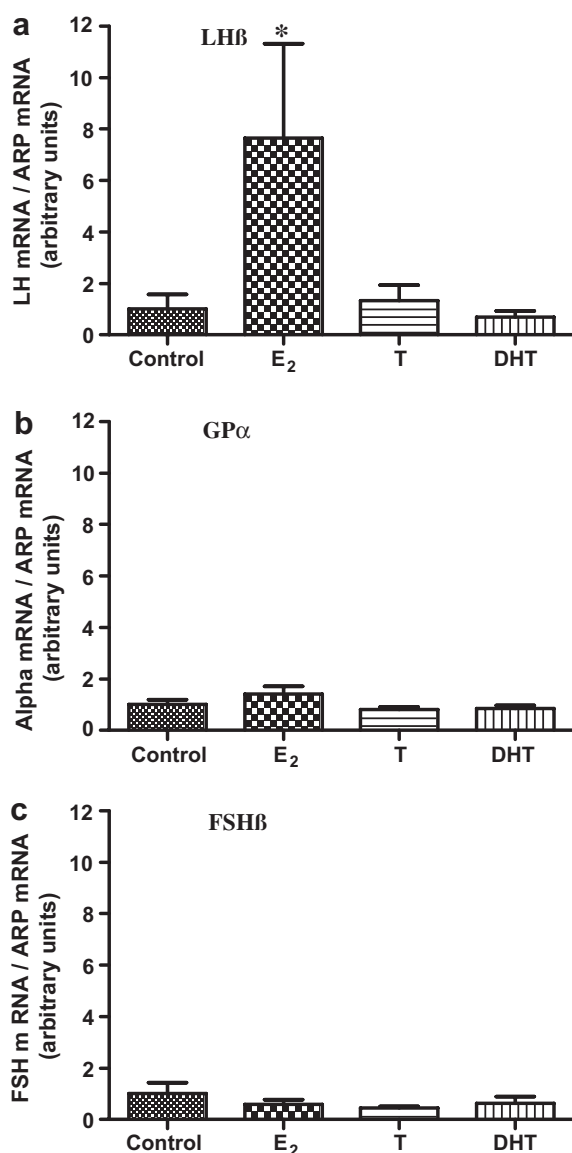


Fig. 1. *In vivo* effects of sex steroid treatments on the expression of gonadotropin subunits. Female silver eels were treated weekly for 8 weeks with estradiol (E₂), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) or vehicle (control). Pituitary mRNA levels for LHβ (a), GPα (b) and FSHβ (c) subunits were quantified by qRT-PCR. Data are normalized to eel ARP. Means are given ± SEM (*n* = 8 eels/group). **P* < 0.05 as compared to controls, ANOVA.

levels were observed after T or DHT treatments (Fig. 1a). Concerning GPα mRNA, a slight but not significant increase of mRNA levels was observed after E₂ treatment (×1.4 as compared to controls, *NS*), and no effect was seen after androgen treatments (Fig. 1b).

In contrast to LHβ, no stimulatory effect of E₂ treatment was shown on FSHβ mRNA levels. In fact, we observed a decreasing tendency on FSHβ mRNA levels following E₂ treatment (×0.6 as compared to controls, *NS*) as well as after T (×0.4 as compared to controls, *NS*) or DHT treatment (×0.6 as compared to controls, *NS*) (Fig. 1c).

3.4. *In vitro* effects of steroids on gonadotropin subunit mRNA expression

The mRNA expression of the three gonadotropin subunits was differentially affected by the *in vitro* sex steroid treatments in dispersed pituitary cell cultures.

In contrast to the *in vivo* experiment, the relative expression of LHβ mRNA was strongly increased following treatment with T (×9.2 as compared to control, *P* < 0.001). A similar increase in LHβ mRNA levels was observed after treatment with the non-aromatizable androgen DHT (×9.3 as compared to control, *P* < 0.001). However, and

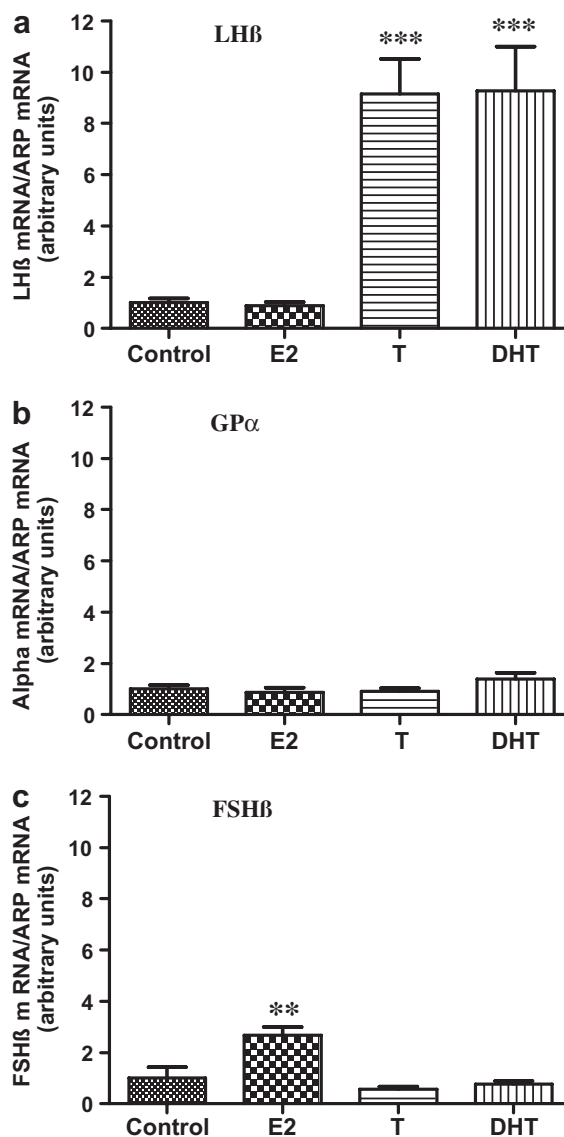


Fig. 2. *In vitro* effects of sex steroid treatments on the expression of gonadotropin subunits. Primary culture of eel pituitary cells were treated for 9 days with estradiol (E₂), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) or vehicle (control) at a final concentration of 10⁻⁷ M. Cell mRNA levels for LHβ (a), GPα (b) and FSHβ (c) subunits were quantified by qRT-PCR. Data are normalized to eel ARP. Means are given ± SEM (*n* = 6-well/group ; 50,000 cells/well). ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 as compared to controls, ANOVA.

contrary to the *in vivo* results, *in vitro* E2 treatment had no effect on LH β mRNA levels (Fig. 2a).

Concerning the GP α subunit, no significant variation was observed after any treatments (Fig. 2b). For FSH β , no significant variations were observed after T or DHT treatments. However, and contrary to the *in vivo* results, a significant stimulatory effect on FSH β mRNA levels was observed after E2 treatment ($\times 2.7$ as compared to control, $P < 0.01$) (Fig. 2c).

4. Discussion

4.1. Development of qrtRT-PCR assays for eel gonadotropin subunits

In the present study, we developed and validated three different qrtRT-PCR assays for the relative quantification of European eel gonadotropin subunits. Messenger RNAs for both LH β and FSH β subunits were detectable in every individual pituitary from control or treated female silver eels. This confirms our previous observations that both gonadotropins are expressed at an early stage of vitellogenesis in the European eel (Aroua et al., 2005; Schmitz et al., 2005).

In these experiments, all mRNA measurements for the different target and reference genes were performed using exactly the same conditions: same cDNA dilution coming from the same cDNA sample synthesized by a single reverse transcription, and similar and optimal (about 100%) PCR efficiency. All these precautions taken, comparison of average Cp values provides some indications on the comparative gene expression levels. Data from the qrtRT-PCR analyses indicate similar average Cp values for both subunits, suggesting that the two hormones are expressed at similar levels. This assumption is further supported by the comparison with another pituitary hormone (growth hormone, GH) known to be expressed at higher levels during silver stage (Marchelidon et al., 1999). Analyses of GH mRNA levels in the control samples showed that this hormone exhibited lower average Cp values compared to FSH β or LH β , indicating higher expression levels of GH. Concerning GP α , its average Cp was also lower than that of LH β and FSH β , suggesting a higher expression in agreement with the fact that GP α is expressed in LH-, FSH- and also thyrotropin (TSH)-producing cells. Even though we should be cautious since these comparisons remain qualitative, they provide relevant indications on the relative expression of these pituitary hormones. A recent study in the Japanese eel, measuring FSH β and LH β transcripts by absolute quantification (using known concentrations of plasmid RNAs as standards) indicated similar pituitary expression levels for both subunits (Jeng et al., submitted for publication) in agreement with our present data.

We also adjusted the qrtRT-PCR assays for use in pituitary primary cell cultures. First, different cell concentrations were tested to optimize the conditions for the

qrtRT-PCR assays. The high sensitivity of qrtRT-PCR allowed us to considerably reduce the density of cells per well as compared to previous work from our group using dot blot assays (Huang et al., 1997). Following careful testing, we chose to work at a concentration of 50,000 cells/well compared to 500,000 cells/well in our previous works (Huang et al., 1997). At this concentration, the mRNAs of the three gonadotropin subunits were detectable by qrtRT-PCR with good reproducibility. The same order of average Cp values was observed as in the *in vivo* experiments (GH > GP α > LH β and FSH β).

The developed assays were used to investigate steroid feedback regulation of gonadotropin expression. To test if the feedbacks were exerted directly or indirectly on pituitary gonadotropin expression, we compared *in vivo* and *in vitro* effects of different steroid treatments. We investigated the effects of E2 and androgens (T and a non-aromatizable androgen, DHT), as both estrogens and androgens are secreted by the eel ovary during vitellogenesis (Qu erat et al., 1985; Qu erat et al., 1987; Sbaihi et al., 2001).

4.2. Sex steroid treatments and cell activity

To normalize the expression of the genes of interest, we need to select a reference gene. Firstly, in accordance with our previous studies (Weltzien et al., 2005, 2006), we chose to use the ribosomal ARP. Indeed, in the present *in vivo* experiments, the ARP expression did not vary significantly between groups. In contrast, in the *in vitro* experiments, slight but significant variations of the ARP transcript could be observed after steroid treatments as compared to control cells. This observation let us to look for other genes traditionally used as reference genes, such as a mitochondrial protein involved in the electron transport in the respiratory chain, the cytb and a protein of the cytoskeleton, the β -actin. Analysis of their expression showed, as for ARP, significant increases of cytb and β -actin expression after sex steroid treatments, cytb having the most marked response. The induction of increasing expression of these three genes, each involved in a different cell function (ribosomal for ARP, mitochondrial for cytb and in cell architecture for β -actin) and the fact that these effects were reproduced in independent experiments, indicate that sex steroids are able to induce a general activation of pituitary cell activity. These general effects are in agreement with previous studies on gonadotropic cell ultrastructure showing a development of the cellular machinery (endoplasmic reticulum, ribosomes) in pituitary gonadotropic cells from steroid treated eels (Olivereau and Chambolle, 1978). However, beside this “background” effect of sex steroids, further and highly significant positive effects could still be demonstrated for gonadotropin β -subunits (see below), indicating a specific activation of these genes. These stimulatory effects were significant whatever the reference gene used (ARP, β -actin or cytb). In contrast, the expression of some other pituitary genes, such as gonadotropin α -subunit, showed only a slight increase in mRNA expression,

similar to that of the reference genes, which was therefore interpreted as a non specific response to sex steroid treatments.

4.3. *In vivo* differential regulation of gonadotropin subunit expression by sex steroids

Our qRT-PCR analyses revealed a significant increase in LH β expression after *in vivo* E2 treatment. This result confirms our previous work on LH β expression using dot blot assay (Schmitz et al., 2005) or Northern blot assay (Qu erat et al., 1991). In addition, it is also in accordance with early histological results showing a strong stimulatory action of E2 on eel gonadotrope cells (Olivereau and Chambolle, 1978; Olivereau and Olivereau, 1979), and also with previous results using radioimmunoassay (RIA) on eel pituitary LH content (Dufour et al., 1983; Montero et al., 1995).

The stimulatory effect on LH β is E2-specific. Indeed, androgen treatments (T or the non-aromatizable androgen DHT) were not able to induce any significant variation in eel LH β mRNA levels. In contrast, studies in other teleosts indicated similar effects of the two steroids E2 and T on LH β expression. In immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), E2 as well as T treatment induced an increase in pituitary LH hormone as measured by RIA (Breton et al., 1997). This effect was also observed in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) after T treatment (Borg et al., 1998). In maturing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), LH β mRNA levels in both sex as well as pituitary levels of LH hormone in females increased following both E2 and T treatment (Dickey and Swanson, 1998). Similar results on LH β mRNA levels were found in juvenile female goldfish (*Carassius auratus*) (Kobayashi et al., 2000) and in mixed sex sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during their sexual resting period (Mateos et al., 2002). These similar effects of E2 and T on LH β expression observed in various teleosts, likely result from local aromatization of T into E2, due to the high brain aromatase activity demonstrated in many teleost species (Callard et al., 1981; Pasmanik and Callard, 1985; Pellegrini et al., 2005). In contrast, a recent study has shown an unusually low brain aromatase activity in the eel compared to other teleost species (*Anguilla japonica*: Jeng et al., 2005). This fact may explain the *in vivo* specific effects of E2 on eel gonadotropin subunits.

Less data are available concerning the regulation of FSH in teleosts. In the present study, *in vivo* sex steroid treatments did not induce any stimulatory effect on FSH β mRNA levels, contrary to the effect on LH β . In contrast, we observed a decreasing tendency in FSH β mRNA expression following steroid treatments. This is in agreement with our previous results using dot blot assay showing an inhibitory effect of T (Schmitz et al., 2005). Such a T inhibitory effect on FSH β mRNA was also reported in mixed sex juvenile goldfish (Kobayashi et al., 2000) and in maturing male and female sea bass (Mateos et al., 2002) and, in these two cases, E2 had the same effect. In

salmonids, sex steroid effects on FSH were shown to depend on the reproductive stage of the fish (Borg et al., 1998; Dickey and Swanson, 1998).

In the present study, a slight but not significant increase in GP α subunit expression was observed following E2 treatment, in agreement with previous works in the eel showing an increase of GP α mRNA (Counis et al., 1987; Qu erat et al., 1991; Schmitz et al., 2005). The limited positive effect of E2 may result from the selective activation of the expression of GP α in LH-producing cells, while not in FSH- or TSH-producing cells.

Taken together, the present *in vivo* results indicate a differential steroid feedback on gonadotropin mRNA expression in the European eel.

Differential variations in eel gonadotropin mRNA expression are observed throughout the gonadal development. During the late stage of silvering, an up-regulation of LH β and a down-regulation of FSH β were observed concomitantly with an increased production of steroids (Aroua et al., 2005). This opposite regulation of LH β and FSH β was amplified during experimental maturation (Schmitz et al., 2005), where exogenous gonadotropic treatments induced gonadal development (Fontaine et al., 1964) and increased the secretion of E2 and T by the eel ovary (Leloup-Hatey et al., 1986; Peyon et al., 1997). In experimentally matured eels, a previous work has also described an elevation of pituitary LH content as compared to controls, an effect prevented by ovariectomy (Dufour et al., 1989). More recently, differential variations in mRNA were observed after experimental maturation: an increase of LH β and GP α and a decrease of FSH β (European eel: Schmitz et al., 2005; Japanese eel: Saito et al., 2003).

All these data suggest that steroid feedbacks play an important role in the differential gonadotropin regulation and that they act not only during vitellogenesis and towards maturation, but also at the early stage of BPG-axis activation.

4.4. *In vitro* differential regulation of gonadotropin subunit expression by sex steroids

To investigate if sex steroids have direct actions on gonadotropin subunit expression, we performed *in vitro* experiments on primary cultures of eel pituitary cells. Our previous investigations indicated that cell culture can be maintained in good conditions (cell attachment and good integrity) for a duration of 2 weeks. Due to low inter-well variations, significant responses of LH expression and synthesis to steroids could be observed after 24 h (Huang et al., 1997) with a time- and dose-dependent manner up to 14 days (Huang et al., 1997, 1998, 1999). In the present experiment, we chose an intermediate duration of treatment (9 days).

Our results demonstrated that there exists a strong direct stimulatory action of T on LH β expression. A similar stimulatory effect was produced after treatment with the non-aromatizable androgen, DHT. In contrast, no LH β

mRNA variation was observed after E2 treatments. These results are in agreement with previous work of our group (Huang et al., 1997) showing a specific effect of androgens on LH β mRNA levels using dot blot assay, as well as at the hormone level using RIA. The present data confirm that steroids can directly act on eel LH regulation and that this effect is androgen-specific.

In other teleosts, some studies also investigated the direct pituitary action of sex steroids. In pituitary cells from juvenile rainbow trout, a stimulatory effect of T on LH β subunit was also demonstrated (Xiong et al., 1994), but in that case, a similar effect was observed after E2 treatment. In cell culture from mature male African catfish (*Clarias gariepinus*), Rebers et al. (2000) observed an elevation of LH β transcript and LH *de novo* synthesis after T or E2 treatments. This effect was prevented when T treatment was combined with an aromatase inhibitor. Similar observations were done in pituitary fragments from early and late recrudescence goldfish (Huggard-Nelson et al., 2002) and in pituitary cells from regressed tilapia (Melamed et al., 1998). At last, it was demonstrated by qRT-PCR in pituitary cells from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) of both sex, that E2 and T but not the non aromatizable androgen 11-ketotestosterone (11-KT), were very effective in stimulating LH β expression during the early stages of maturation (Ando et al., 2003).

These similar effects of E2 and T let many authors to suggest that the effect of T may be mediated by local aromatization into E2. In salmonids, this explanation is enforced by the characterization of an estrogen response element (ERE) but no androgen response element (ARE) in the promoter region of the LH β gene (Xiong et al., 1994).

In contrast, in the eel, the androgen-specific effect *in vitro* and the lack of effect of E2 suggest that the promoter of LH β would include an ARE rather than an ERE. Cloning and sequencing of the eel LH β promoter region would provide new information on the evolution of LH regulatory mechanisms among teleost groups.

Concerning GP α mRNA levels, we did not observe any further effect of sex steroids *in vitro* than that observed on reference genes, indicating no specific activation in agreement with the previous work of Huang et al. (1997) using dot blot assay. A negative effect of androgens and also E2 on GP α expression has been reported in mammals (for review: Gharib et al., 1990; Burger et al., 2004). In contrast, GP α subunit mRNA expression was stimulated following *in vitro* E2 treatment in early and late recrudescence goldfish (Huggard-Nelson et al., 2002), and sexually mature male African catfish (Rebers et al., 2000). In African catfish (Rebers et al., 2000) the same effect on GP α expression was observed after T treatment.

Concerning the direct action of sex steroids on FSH β regulation, the present results are the first obtained in eels. In contrast to the LH β subunit, the expression of FSH β was not affected by androgen treatments. However, a stimulatory effect of E2 was observed. This indicates that there

exists, *in vitro*, an estrogen-specific effect on FSH β expression. Similar results were observed in goldfish pituitary cells (Huggard-Nelson et al., 2002). In tilapia pituitary cells, the effects of steroids on FSH β expression were shown to depend on the developmental stage: androgens (T or 11-KT) induced an increase in immature fish, had no effect in maturing, and decreased the expression in cells from mature fish (Yaron et al., 2003).

4.5. Comparison between *in vivo* and *in vitro* experiments: direct and indirect effects of sex steroids

The comparison between *in vivo* and *in vitro* studies reveals direct and indirect pathways used by the sex steroids to exert their feedback actions.

In the present study, we observed striking discrepancies between *in vitro* and *in vivo* sex steroid effects on regulation of gonadotropin subunits. The differences concerned gonadotropin subunit regulations, as well as the sex steroid specificity of action.

Variations between *in vivo* and *in vitro* regulations are not unusual and have been observed for instance in mammals regarding LH regulation. It has been demonstrated that there exists an ERE in the promoter region of the LH β gene suggesting a direct positive regulation by E2. Accordingly, *in vitro* treatments with E2 of rat or cow pituitary cells induced an increase in LH β mRNA levels (for review: Gharib et al., 1990). Nevertheless, in mammals, *in vivo* steroid feedbacks on gonadotropins are mostly negative during the reproductive cycle. Positive feedback is observed only during a short period to induce the preovulatory LH surge. All these data indicate that the direct positive effect of steroids on the LH β promoter is, *in vivo*, overridden by the indirect pathway, via their effect on GnRH control (Gharib et al., 1990).

In the eel, *in vivo*, E2 is able to induce a strong stimulation of LH β mRNA, while E2 has no effect *in vitro*. This demonstrates an indirect effect of E2 on LH β expression, which may be exerted at different levels. At the cerebral level, the positive feedback may be exerted via GnRH. Indeed, a previous study of our group has shown a concomitant increase in mammalian GnRH peptide (mGnRH) and in LH hormone in E2 treated eels (Montero et al., 1995). On the other hand, a recent study from our group showed that E2 treatment had no effect on the activity of the dopaminergic neurons involved in the inhibitory regulation of LH in the eel (Weltzien et al., 2006). E2 would therefore modulate the balance between the stimulatory and inhibitory neuroendocrine control of LH, in favor of the stimulatory action of GnRH. Another site of E2 action could still be the gonadotrope cells themselves, not directly on the gonadotropin genes but on the expression of GnRH and/or DA receptors. In female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), it has recently been demonstrated that *in vivo* E2 treatment modulates both GnRH receptors (gnrhr1 and

gnrhr3) and DA receptor (drd2) mRNAs (Levavi-Sivan et al., 2006).

In contrast to the regulation of eel LH β , E2 had a stimulatory *in vitro* effect on FSH β , and *in vivo* had no significant effect on the expression of FSH β . These different responses of gonadotropin mRNAs to *in vivo* E2 treatment suggest a striking differential cerebral control of the two hormones FSH and LH, with a lower importance of GnRH regarding FSH regulation, as indicated in mammals (Burger et al., 2004). This differential regulation may be further favored by the fact that LH and FSH are synthesized by different pituitary cell types, in the eel (Schmitz et al., 2005) as in the other teleosts (Weltzien et al., 2004).

Concerning the effects of androgens in eel, a strong and specific stimulatory action on LH β mRNA levels was observed *in vitro*, while *in vivo* no significant effects were observed. This discrepancy could be explained by recent data of our group indicating a strong stimulatory action of androgens on dopaminergic neuron activity, specifically in the rostral preoptic area region where are located the hypophysiotropic neurons directly controlling the gonadotrope cells (Weltzien et al., 2006). Moreover, in the eel, androgen treatments alone have no effects on mGnRH peptide (Montero et al., 1995). In this case, the cerebral control of LH expression, which consists of a balance of GnRH and DA, would tend towards an inhibition. Thus, indirect effects of androgens at the cerebral level may counteract their direct stimulatory actions on pituitary LH expression. The regulation may even be more complex with additional potential effects of androgens on GnRH receptors. Indeed, our group demonstrated in a previous work that only T pre-treated eels responded to GnRH treatment (Vidal et al., 2004).

In contrast, for FSH β mRNA levels, androgen effects were weaker both *in vivo* and *in vitro* compared to those observed on LH β expression. It is well known in mammals that FSH regulation is not only depending on steroid and cerebral hormones, but also on multiple other factors. Gonadal peptides (activin, inhibin and follistatin) have an important role in the mammalian FSH regulation, and activin have also been detected in different fish species (goldfish: Ge and Peter, 1994; Ge et al., 1997; rainbow trout: Tada et al., 1998; zebrafish (*Danio rerio*): Wu et al., 2000; Japanese eel: Miura et al., 1999). Our further studies in the eel will specifically focus on the regulation of FSH and investigate the potential role of gonadal peptides.

In conclusion, in the present study, we developed qRT-PCR assays specific for eel gonadotropin subunits, which were applicable in both *in vivo* and *in vitro* systems. This powerful method has permitted to detect and quantify the three subunits LH β , FSH β and GP α in small samples. It also allowed us to test and compare the direct and indirect effects of sexual steroids on the regulation of gonadotropin subunits expression.

Acknowledgments

We are grateful to Drs. C. Pasqualini and P. Vernier, CNRS Gif-sur-Yvette, for their hospitality and for their advice. This work was partly supported by European project EELREP to S.D. (Project No. Q5RS-2001-01836) and France–Norway AURORA Project No. 12413PG to S.D. and F.-A.W.

References

- Ando, H., Swanson, P., Urano, A., 2003. Regulation of LH synthesis and release by GnRH and gonadal steroids in masu salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 61–63.
- Aroua, S., Schmitz, M., Baloche, S., Vidal, B., Rousseau, K., Dufour, S., 2005. Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 82, 221–232.
- Billard, R., Richard, M., Breton, B., 1977. Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33, 163–165.
- Borg, B., Antonopoulou, E., Mayer, I., Andersson, E., Berglund, I., Swanson, P., 1998. Effects of gonadectomy and androgen treatments on pituitary and plasma levels of gonadotropins in mature male Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr - Positive feedback control of both gonadotropins. *Biol. Reprod.* 58, 814–820.
- Breton, B., Sambroni, E., Govoroun, M., Weil, C., 1997. Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 320, 783–789.
- Burger, L.L., Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C., Marshall, J.C., 2004. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 559–584.
- Callard, G.V., Petro, Z., Ryan, K.J., Clairborne, J.B., 1981. Estrogen synthesis *in vitro* and *in vivo* in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 43, 243–255.
- Counis, R., Dufour, S., Ribot, G., Quérat, B., Fontaine, Y.A., Jutisz, M., 1987. Estradiol has inverse effects on pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit messenger ribonucleic acid in the immature European eel and the gonadectomized rat. *Endocrinology* 121, 1178–1184.
- Crim, L.W., Evans, D.M., 1979. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 37, 192–196.
- De Leeuw, R., Wurth, Y.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Goos, H.J.Th., 1986. The effects of aromatizable androgens, non-aromatizable androgens and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). A physiological and ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 243, 587–594.
- Dickey, J.T., Swanson, P., 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Mol. Endocrinol.* 21, 291–306.
- Dufour, S., Delerue-Le Belle, N., Fontaine, Y.A., 1983. Effects of steroid hormones on the pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 52, 190–197.
- Dufour, S., Le Belle, N., Baloche, S., Fontaine, Y.A., 1989. Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla* L. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 157–162.
- Dufour, S., Burzawa-Gerard, E., Le Belle, N., Sbaihi, M., Vidal, B., 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K. (Eds.), *Eel Biology*. Springer, Tokyo, pp. 373–383.
- Dufour, S., Weltzien, F.-A., Sébert, M.-E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Pasqualini, C., 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in

- teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040, 9–22.
- Fontaine, M., Bertrand, E., Lopez, E., Callamand, O., 1964. Sur la maturation des organes génitaux de l'anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. *C. R. Acad. Sci. Paris* 259, 2907–2910.
- Garcia Ayala, A., Villaplana, M., Garcia Hernandez, M.P., Chaves Pozo, E., Agulleiro, B., 2003. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 72–79.
- Ge, W., Peter, R.E., 1994. Activin-like peptides in somatotrophs and activin stimulation of growth hormone release in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 213–221.
- Ge, W., Miura, T., Kobayashi, H., Peter, R.E., Nagahama, Y., 1997. Cloning of cDNA for goldfish activin beta B subunit, and the expression of its mRNA in gonadal and non-gonadal tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 37–45.
- Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., Chin, W.W., 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrinol. Rev.* 11, 177–199.
- Gong, C., Cao, G., Xue, R., Zhang, C., 2002. Sequence and structure of encoding eel growth hormone gene. *Shuichan Xuebao* 26, 295–300.
- Huang, Y.S., Schmitz, M., Le Belle, N., Chang, C.F., Quérat, B., Dufour, S., 1997. Androgens stimulate gonadotropin-II β -subunit in eel pituitary cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131, 157–166.
- Huggard-Nelson, D.L., Nathwani, P.S., Kermouni, A., Habibi, H.R., 2002. Molecular characterization of LH- β and FSH- β subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188, 171–193.
- Jeng, S.-R., Dufour, S., Chang, C.-F., 2005. Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Exp. Zool.* 303A, 802–812.
- Jeng, S.-R., Yueh, W.-S., Chen, G.-R., Lee, Y.-H., Dufour, S. and Chang, C.-F., 2007. Differential Expression and Regulation of Gonadotropins and Their Receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Submitted paper.
- Kagawa, H., Kawazoe, I., Tanaka, H., Okuzawa, K., 1998. Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GtHI and GtHII) in the pituitary of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 11–18.
- Kobayashi, M., Stacey, N.E., 1990. Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool. Sci.* 7, 715–721.
- Kobayashi, M., Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., Aida, K., 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Sci.* 66, 223–231.
- Larsen, D.A., Swanson, P., 1997. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 152–160.
- Levavi-Sivan, B., Biran, J., Fireman, E., 2006. Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biol. Reprod.* 75, 642–650.
- Leloup-Hatey, J., Hardy, A., Nahoul, K., Quérat, B., Zohar, Y., 1986. Influence of gonadotrophic treatment upon the ovarian steroidogenesis in European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). In: INRA, Paris, Les colloques de l'INRA, n°44 Reproduction chez les poissons. Bases fondamentales et appliquées en endocrinologie et génétique. Tel-Aviv, pp. 127–130.
- Lin, Y.S., Poh, Y.P., Tzeng, C.S., 2001. A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 252–261.
- Magliulo-Cepriano, L., Schreiber, M.P., Blum, V., 1994. Distribution of variant forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone and beta-gonadotropins I and II in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94, 135–150.
- Marchelidon, J., Le Belle, N., Hardy, A., Vidal, B., Sbaihi, M., Burzawa-Gérard, E., Schmitz, M., Dufour, S., 1999. Etude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison: application à la caractérisation du stade argenté. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 355, 349–368.
- Mateos, J., Mananos, E., Carrillo, M., Zanuy, S., 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 75–86.
- Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z., 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119, 325–338.
- Miura, C., Miura, T., Kudo, N., Yamashita, M., Yamauchi, K., 1999. cDNA cloning of a stage-specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev. Growth Differ.* 41, 463–471.
- Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., Dufour, S., 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61, 525–535.
- Montero, M., Le Belle, N., Vidal, B., Dufour, S., 1996. Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104, 103–115.
- Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Miyata, K., Nakai, Y., Oota, Y., Suzuki, K., Kawachi, H., 1990. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins GtHI and GtHII. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 348–357.
- Olivereau, M., Chambolle, P., 1978. Ultrastructure of gonadotropic cells of the normal eel and after estradiol injection. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 287, 1409–1412.
- Olivereau, M., Olivereau, J., 1979. Effect of estradiol-17 β on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. *Cell. Tissue Res.* 199, 431–454.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 244–251.
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 60–66.
- Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H., Billard, R., 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Prog. Horm. Res.* 42, 513–548.
- Peyon, P., Baloch, S., Burzawa-Gerard, E., 1997. Investigation into the possible role of androgens in the induction of hepatic vitellogenesis in the European eel: In vivo and in vitro studies. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 107–118.
- Quérat, B., Hardy, A., Leloup-Hatey, J., 1985. Niveaux plasmatiques, vitesses de clairance métabolique, et vitesses de sécrétion de la testostérone et de l'oestradiol-17 β chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) argentée. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 482–493.
- Quérat, B., Nahoul, K., Hardy, A., Fontaine, Y.A., Leloup-Hatey, J., 1987. Plasma concentrations of ovarian steroids in the freshwater European silver eel (*Anguilla anguilla* L.): effects of hypophysectomy and transfer to sea water. *J. Endocrinol.* 114, 289–294.
- Quérat, B., Jutisz, M., Fontaine, Y.A., Counis, R., 1990a. Cloning and sequence analysis of the cDNA for the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit of the European eel. *Mol. Cell. Endocrinol.* 71, 253–259.
- Quérat, B., Moumni, M., Jutisz, M., Fontaine, Y.A., Counis, R., 1990b. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative beta subunit of the type-II gonadotrophin from the European eel. *J. Mol. Endocrinol.* 4, 257–264.
- Quérat, B., Hardy, A., Fontaine, Y.A., 1991. Regulation of the type-II gonadotrophin alpha and beta subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *J. Mol. Endocrinol.* 7, 81–86.
- Rebers, F.E., Hassing, G.A., Zandbergen, M.A., Goos, H.J., Schulz, R.W., 2000. Regulation of steady-state luteinizing hormone messenger

- ribonucleic acid levels, de novo synthesis, and release by sex steroids in primary pituitary cell cultures of male African catfish, *Clarias gariepinus*. *Biol. Reprod.* 62, 864–872.
- Saito, K., Lokman, P.M., Young, G., Ozaki, Y., Matsubara, H., Okumura, H., Kazeto, Y., Yoshiura, Y., Aida, K., Adachi, S., Yamauchi, K., 2003. Follicle-stimulating hormone β , luteinizing hormone β and glycoprotein hormone (subunit mRNA levels in artificially maturing Japanese eel *Anguilla japonica* and naturally maturing New Zealand long-finned eel *Anguilla dieffenbachii*. *Fisheries Sci.* 69, 146–153.
- Sbaihi, M., Fouchereau-Peron, M., Meunier, F., Elie, P., Mayer, I., Burzawa-Gérard, E., Vidal, B., Dufour, S., 2001. Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the European eel. *J. Fish. Biol.* 59, 302–319.
- Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Le Belle, N., Elie, P., Dufour, S., 2005. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81, 107–119.
- Stone, R., 2003. Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* 302, 221–222.
- Tada, T., Hirono, I., Aoki, T., Takashima, F., 1998. Structure and expression of activin genes in rainbow trout. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 72–77.
- Vidal, B., Pasqualini, C., Le Belle, N., Holland, M.C., Sbaihi, M., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S., 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol. Reprod.* 71, 1491–1500.
- Weltzien, F.-A., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian-Tabrizi, K., Norberg, B., 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 447–477.
- Weltzien, F.-A., Pasqualini, C., Vernier, P., Dufour, S., 2005. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 134–142.
- Weltzien, F.-A., Pasqualini, C., Sébert, M.-E., Vidal, B., Le Belle, N., Kah, O., Vernier, P., Dufour, S., 2006. Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147, 2964–2973.
- Wu, T., Patel, H., Mukai, S., Melino, C., Garg, R., Ni, X., Chang, J., Peng, C., 2000. Activin, inhibin, and follistatin in zebrafish ovary: expression and role in oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 62, 1585–1592.
- Xiong, F., Liu, D., Le Drean, Y., Elsholtz, H.P., Hew, C.L., 1994. Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary Gonadotropin II beta subunit gene during salmon maturation. *Mol. Endocrinol.* 8, 782–793.
- Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B., 2003. Regulation of fish gonadotropins. *Int. Rev. Cytol.* 225, 131–185.

4. Article 4 : «Activin differentially regulates luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression by eel pituitary cells». Aroua S et al

4.1. Résumé des résultats

Les peptides gonadiques jouent un rôle majeur dans la régulation de la FSH chez les mammifères mais leurs rôles chez les téléostéens a fait l'objet de peu de travaux. Nous avons abordé cette étude chez l'anguille.

4.1.1. Distribution de la sous-unité β B de l'activine chez l'anguille

Nous avons développé le dosage par PCR quantitative en temps réel (qrt-PCR) de la sous-unité β B de l'activine de l'anguille. Les amorces ont été choisies d'après la séquence clonée chez l'anguille japonaise à partir de testicules. L'étude de la distribution tissulaire chez l'anguille femelle argentée montre que l'activine β B est exprimée non seulement dans les ovaires mais aussi dans différentes parties du cerveau et dans l'hypophyse. En revanche, elle est très peu exprimée (limite de détection) dans le foie et le muscle.

4.1.2. Effets de l'activine B sur l'expression des sous-unités des gonadotropines

Afin d'aborder l'étude du rôle possible des peptides gonadiques dans la régulation différentielle des gonadotropines chez l'anguille, nous avons recherché l'effet de l'activine B recombinante humaine *in vitro* (cultures primaires de cellules hypophysaires) sur l'expression des sous-unités des gonadotropines dosées par qrt-PCR.

L'activine B a un effet stimulateur sur l'expression de la FSH β qui augmente avec le temps et avec la dose de traitement (10^{-10} M à 10^{-7} M). A la concentration maximale étudiée (10^{-7} M), l'expression de FSH β est multipliée par 16 par rapport aux cellules témoins ($P < 0.001$).

L'expression de LH β n'est pas stimulée par l'activine, contrairement à l'effet positif sur FSH β . On peut même observer une baisse significative des taux d'ARNm codant pour la sous-unité LH β en présence de fortes doses d'activine (activine 10^{-7} M : x 0.5 comparé aux témoins, $P < 0.01$).

4.1.3. Interactions de la follistatine et de l'activine sur l'expression de la FSH β

La follistatine recombinante humaine seule (10^{-12} M à 10^{-7} M) n'a pas d'effets significatifs sur l'expression des sous-unités LH β et FSH β . En revanche, en combinaison avec l'activine, elle est capable d'inhiber de façon dose dépendante l'effet stimulateur de l'activine sur l'expression de la FSH β .

4.1.4. Interactions de la testostérone et de l'activine sur l'expression de la LH β

Pour nous assurer de l'effet inhibiteur de l'activine sur l'expression de LH β , nous avons décidé de travailler sur des cellules dont l'expression de LH β est stimulée par des traitements par la testostérone (T) en accord avec nos précédents travaux. Un effet inhibiteur et dose-dépendant de l'activine sur l'expression de la LH β a été observé dans les cellules ayant reçu un traitement combiné T+activine par rapport aux cellules traitées par T seul ($P < 0.001$).

L'ensemble de ces résultats indique que les peptides gonadiques sont capables de jouer un rôle dans la régulation différentielle des gonadotropines et que ce rôle peut être exercé directement au niveau hypophysaire.

4.2. Texte de l'article 4 : «Activin and follistatin differentially regulate luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression by eel pituitary cells ». Aroua S et al (à soumettre)

Activin differentially regulates luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression by eel pituitary cells.

Saima Aroua, Sylvie Bache, Nadine Le Belle, Karine Rousseau and Sylvie Dufour.

MNHN, Département des Milieux et Peuplements Aquatiques, USM 0401, UMR 5178 CNRS, 7 rue Cuvier, CP 32, 75231 Paris Cedex 05, France

27 pages, 5 figures

Short title: Activin differentially regulates eel gonadotropins in vitro.

Key words: activin, follistatin, gonadotropin, eel, cell culture.

Correspondence should be addressed to:

Dr. Sylvie Dufour

Muséum National d'Histoire naturelle

Département des Milieux et Peuplements Aquatiques

USM 0401 UMR 5178 CNRS - 7 rue Cuvier, CP 32

75231 Paris Cedex 05 - France

Phone: 00 33 (0)1 40 79 36 12

Fax: 00 33 (0)1 40 79 36 18

e-mail: dufour@mnhn.fr

Introduction

Gonadotropins, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), are glycoprotein hormones constituted of two subunits, α (GP α) and β . While GP α is common for both hormones, β is hormone specific and confers the biological activity to each hormone. LH and FSH are members of the brain-pituitary-gonad axis, which is involved in the control of the reproductive function in vertebrates. LH and FSH play their actions on gonads inducing gametogenesis and sexual steroid production. In turn, the sexual steroids regulate cerebral and pituitary factors through differential feedback mechanisms (Gharib et al, 1990). In vertebrates, gonadotropin production and release are under the stimulatory control of brain GnRH. In addition, in some teleosts, a cerebral inhibitory control is exerted by dopamine (DA) (for review: Dufour et al., 2005). Besides these controls, gonadal peptides, play an important role in gonadotropin control (for review: Ying, 1988). These peptides, inhibin and activin, were first purified from porcine follicular fluid for their ability to inhibit and stimulate FSH release from cultured pituitary cells, respectively (inhibin: Miyamoto et al., 1985; Rivier et al., 1985; Robertson et al., 1985; activin: Ling et al., 1986; Vale et al., 1986). Shortly after, they were also implicated in the control of FSH synthesis (Carroll et al., 1989). During the purification of activins and inhibins, another unrelated protein was purified and characterized (Esch et al., 1987; Robertson et al., 1987; Ueno et al., 1987). This protein, named follistatin, was shown to decrease the basal release of FSH (Ueno et al., 1987), as well as FSH β mRNA levels (Carroll et al., 1989) in rat anterior pituitary culture system. The effects of these three gonadal peptides on FSH in mammals were found to be specific, as no changes in LH were observed (for review: Gregory and Kaiser, 2004).

Activins and inhibins are members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, and result from the dimerization of three distinct gene products: α , β_A and β_B . Inhibins result from the association of one α subunit and one of β subunits ($\alpha\beta_A$ and $\alpha\beta_B$) and activins from the association of two β subunits ($\beta_A\beta_A$ or $\beta_B\beta_B$ or $\beta_A\beta_B$) (for reviews: Vale et al, 1988; Ying 1988). In mammals, the inhibin/activin subunits are expressed, not only in the gonads, but also in various tissues including the pituitary (Meunier et al., 1988; Bilezikjian et al,

1993). Moreover, some works on rats have shown that these subunits are expressed in gonadotrope cells (Roberts et al, 1989). Follistatin is an activin-binding protein (Nakamura et al., 1990), which was found to neutralize activin bioactivities on different cell systems: embryonic mesoderm (Asashima et al., 1991), pituitary cells (Carroll et al., 1989; Kogawa et al., 1991) and ovarian granulosa cells (Xiao and Findlay, 1991; Shukovski et al., 1991; Xiao et al., 1992a,b). As for inhibin/activin genes, follistatin is detected, not only in gonads, but also in a wide range of tissues including pituitary (Michel et al, 1990), where its expression is localized in gonadotrope cells (Kaiser et al, 1992). These observations suggest that in mammals, the actions of activin, inhibin and follistatin could be exerted locally as autocrine/paracrine effects on gonadotropins.

In teleosts, gonadal peptides and their effects have been hitherto poorly studied. The first data, which suggested the existence of activin/inhibin-like system and its potential role on gonadotropins, were reported in goldfish by Ge and collaborators. They showed that treatments of goldfish pituitary cells with porcine inhibin A ($\alpha\beta_A$) or activin A ($\beta_A\beta_A$) induced an increase in gonadotropin release (Ge et al, 1992). This group later demonstrated, still using goldfish pituitary cells, that activin could differentially control gonadotropins, by increasing FSH β expression and reducing LH β expression (Yam et al., 1999). However, preliminary studies in two other teleost species did not report such an opposite action of activin on FSH and LH. Recombinant human activin A added to tilapia cultured pituitary cells induced an increase in all gonadotropin subunit mRNAs (FSH β , LH β and GP α : Yaron et al., 2001). In contrast, pituitary cells of coho salmon responded to recombinant human activin A by an increase in mRNA of both GP α and FSH β , with no effect on LH β (Davies et al, 2000). Concerning follistatin, first works performed on cultured pituitary cells of goldfish have shown that recombinant porcine follistatin is able to control gonadotropin expression by inducing differential effects on FSH and LH (Yuen and Ge, 2004).

Immunocytochemical and RT-PCR studies in teleosts have shown the presence of activin protein and mRNA in a variety of tissues including brain, pituitary and gonads (goldfish: Ge et al, 1993, 1997; grey mullet: Mousa and Mousa, 2003). Follistatin was also found to be expressed in a wide range of tissues including pituitary (zebrafish: Bauer et al., 1998; catfish: Gregory et al., 2004; goldfish: Cheng et al., 2007). These distributions suggested possible paracrine/autocrine control of gonadotropins by activin and follistatin in teleosts.

Eels have a particular life cycle with a long sedentary stage during which animals are considered as juveniles. They remain blocked at a prepubertal stage (silver stage) as long as the reproductive migration is prevented. This blockade is due to a deficient production of pituitary gonadotropins (for review: Dufour et al, 2003, 2005). In our previous studies, we showed an increase in FSH β expression early during silvering. This was later followed by a decrease in mRNA levels coding for FSH β and a concomitant increase in LH β mRNA levels (Aroua et al, 2005). A differential regulation of gonadotropin subunits was also observed during the experimental maturation (Schmitz et al, 2005). This particularity makes eel a good model for the study of gonadotropin differential regulations.

The comprehension of mechanisms controlling reproduction in the eel is of particular interest considering the dramatic decline of wild populations (Stone, 2003) and the present impossibility to reproduce European eels in captivity. Moreover, as eel is a representative species of a phylogenetically ancient group of teleosts (elopomorphes) (De Pinna, 1996), understanding the gonadotropin regulation in this species will provide informations on ancestral regulatory mechanisms. The aim of this present study is to investigate the possible direct role of the activin/follistatin on gonadotropin regulation in the eel, by using primary culture of pituitary cells.

Materia and methods

Animals

Female European eel (*Anguilla anguilla*) were netted during their downstream migration by professional fishermen in the Loire river. Animals were transferred to the laboratory (MNHN, Paris, France) and kept in running aerated freshwater tanks under natural photoperiod and temperature ($15\pm 2^{\circ}\text{C}$). Because eels undergo a natural starvation at the silver stage, they were not fed. Animal manipulations were performed according to French regulations and the European convention on animal experimentation for scientific research.

Hormones

Recombinant human activin B and recombinant human follistatin were purchased from R&D system (Lille, France). Testosterone (T) was purchased from Sigma (Lyon, France).

Sample collection for tissue distribution

Tissues were collected from three female silver eels to investigate the distribution of activin β_B subunit expression. Eels were sacrificed by decapitation. The following organs were quickly removed and kept frozen at -20°C in RNA later (Ambion Inc., Austin, Tex., USA) until extraction: brain, pituitary and ovary, liver, muscle samples. Before being frozen, brain was dissected in two parts: part A comprised olfactory bulbs, telencephalon and diencephalon, and part B corpus cerebellum and medulla oblongata.

Tissue RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from samples was extracted using Trizol reagent (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's recommendations. For each tissue, pools from three animals were performed. Pools were homogenised in 200 μl of Trizol reagent by sonication a few seconds for brain and pituitaries, or grinding with ultraturax for ovaries, liver and muscle. Following extraction, samples were submitted to treatment with a deoxyribonuclease I (DNA-free, Ambion Inc.), and first strand cDNA was synthesized using 200 ng of total RNA as template. The RNA was preincubated with 100 ng of random primers and 10 mmol deoxynucleotide triphosphate (Invitrogen), then the RT reaction was set up using 0.1M DTT, 40 U ribonuclease inhibitor, and 200 U Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) in a 20 μl final reaction volume.

Primary culture of eel pituitary cells

Dispersion and primary culture of pituitary cells were performed using an enzymatic and mechanical method as described by Montero et al. (1996). Briefly, pituitaries were collected, washed and cut into 1-mm slices. Slices were incubated at 25°C in a solution of porcine type II trypsin (Sigma) during 1 h. The reaction was stopped by replacement of the trypsin solution by a solution of DNase (Sigma) and soya bean trypsin inhibitor (Sigma) for 10 min. Pituitary slices were then washed with calcium free phosphate buffer (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy-Pontoise,

France) and mechanically dispersed by repeated passages through a plastic transfer pipette (Falcon, Dutscher, Brumath, France). After estimating the number of viable cells by Trypan Blue coloration (Sigma), cells (50,000 cells/well) were plated on 96-well plates pre-coated with poly-L-Lysine (Sigma). Cultures were performed in serum-free culture medium (CM: Medium 199 with Earle's salt, sodium bicarbonate, 100U/ml penicillin, 100µl/ml streptomycin, 250ng/ml fungizone (Gibco) at 18°C under 3% CO₂ and saturated humidity.

In vitro treatments

The start of treatments began 24h after the start of culture (Day 0) to allow cell attachment. Stock solutions of recombinant human activin B (5×10^{-5} M), recombinant human follistatine (5×10^{-6} M) were prepared in sterile PBS (Gibco) and testosterone stock solution (10^{-3} M) was prepared in ethanol. All stock solutions were stored at 4°C. culture medium were changed and hormonal treatments were added to wells on Day 1, Day 4, Day 7. Stock solutions were diluted in culture medium just before their addition to culture wells. Control wells were treated with ethanol or PBS. Cultures were stopped on Day 4 or Day 9. Media and treatments were renewed every 3 days.

Cell RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction and cDNA synthesis from culture cells were performed according to the method previously described in Aroua et al (2007). Total RNA was directly extracted in each culture well using the Cell-to-cDNATMII kit (Ambion Inc.). After washing with sterile PBS (Gibco), cells were lysed with the Cell Lysis II buffer (80µl/well) and the lysates submitted to a deoxyribonuclease I treatment (Ambion Inc.). Then, cDNA synthesis was performed in a 20 µl final reaction volume. Five µl of the cell lysate was preincubated with 100 ng of random primers and 10 mmol deoxynucleotide triphosphate (Invitrogen). The RT reaction was then set up using 0.1 M DTT, 40 U ribonuclease inhibitor, and 200 U Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen).

Quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR) assays

Real time RT-PCR analyses for eel LH β and FSH β subunits were performed according to the method described in Aroua et al (2007). In addition, real time RT-PCR assays were developed for the activin β_B subunit.

Gene specific primers were designed based on the nucleotide sequence of the European eel FSH β cDNA (Schmitz et al, 2005), LH β cDNA (Quérat et al, 1990) and ARP cDNA (Weltzien et al, 2005) which will be used as reference gene (for details of the primers, see Aroua et al., 2007). For activin, primers were designed based on nucleotide sequence of the Japanese eel activin β_B cDNA (GenBank accession N°. AB023556, Miura et al, 1999): reverse GAC GAC GTG AGT TCA TCT GAT T, and forward CAG GGA AAG TTC GGG AAG AC.

PCR reactions were prepared with 4 μ l of diluted cDNA template, forward and reverse primers (7.5 pmol each), and SYBR Green Master Mix (3 μ l) at a final volume of 15 μ l, and assays were set up using the Light Cycler system (Roche, Meylan, France) at the following conditions: an initial activation of the Taq polymerase at 95°C for 10 min, followed by 41 cycles of PCR: 95°C for 15 s, 60°C for 5 s and 72°C for 10 s.

To assess the PCR efficiency and to be used as the standard curve for the target genes (FSH β , LH β , act β_B and ARP), serial dilutions of cDNA pool made from several wells (for *in vitro* experiment) or from several samples (tissue distribution experiment) were run in duplicate. Relative expression levels were calculated by: $\text{relative expression} = E_{\text{target}}^{\Delta C_p (\text{calibrator} - \text{sample})} \times E_{\text{reference}}^{\Delta C_p (\text{sample} - \text{calibrator})}$, where C_p is the crossing point (cycle number at which fluorescence increases above a background threshold level) and E is the efficiency of the PCR amplification. PCR conditions were designed in order to get E near 100%.

Data analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using InStat 3.0b (GraphPad, Inc., San Diego, CA). Comparison of means was performed with a one-way ANOVA followed by the Dunnett comparison post-test. The level of significance was set to 0.05.

Results

Tissue distribution of activin B subunit expression in European eel (Figure 1)

Tissue expression of activin B in European eel was examined by PCR amplification using specific primers for activin B, which were designed based on the cDNA sequence of Japanese eel activin B. mRNA coding for activin B was detected in the different tissues of the gonadotropic axis: brain, pituitary and ovaries. Part A of the brain, which corresponds to the neuroendocrine part of the brain, expressed more activin than part B. Activin mRNA levels were at the limit of detection in the muscle and the liver.

Kinetics of the effects of activin B on FSH β and LH β expression (Figure 2)

The effect of activin B on gonadotropin expression was analyzed at different time to determine the better time culture for experiments. Dispersed pituitary cells treated by recombinant human activin B (10^{-8} M) or vehicle were cultured during 4 (Day 4) and 9 (Day 9) days.

Activin treatments induced strong increase of the relative expression of FSH β mRNA. At day 4 of culture, a significant increase in FSH β mRNA level was observed (x 4 as compared to Day 4 control, $P < 0.001$). At Day 9, FSH β expression in activin treated cells reached a level 13 fold higher than in Day 9 control cells ($P < 0.001$) (Figure 2A).

Concerning LH β expression in pituitary cells after activin B treatments, there was no or only weak variations. At Day 4, no significant change on LH β mRNA levels was observed between activin B treated and control cells. At Day 9, a significant variation on LH β expression was observed in activin B treated cells. In contrast to the effect on FSH β expression, activin B induced a decrease in LH mRNA levels (x 0.6 as compared to Day 9 control, $P < 0.05$) (Figure 2B).

As activin effect on gonadotropins was higher after 9 days of culture, this duration of treatment was chosen for the following experiments.

Dose-dependent effect of activin B on FSH β and LH β expression (Figure 3)

The effects of various doses of recombinant human activin B were tested over 9 days of treatment. Activin B has a dose-dependent stimulating effect on FSH β expression. The increase in FSH β mRNA levels induced by activin B was significant at 10^{-10} M ($P < 0.01$). The highest

stimulatory effect on FSH β mRNA level was observed at the concentration of 10^{-7} M of activin B (x 16 as compared to control, $P < 0.001$) (Figure 3).

In contrast, LH β expression decreased after activin B treatment with a significant decrease at 10^{-9} M (x 0.4, $P < 0.01$) and 10^{-7} M (x 0.5, $P < 0.01$). However, this effect seems poorly sensitive to the different doses of activin B tested (10^{-10} M to 10^{-7} M) as no dose dependent relation was observed (Figure 3).

Effects of follistatin and activin B effects on FSH β and LH β expression (Figure 4)

To test the specificity of action of activin B, we performed treatments with follistatin, a protein that binds specifically to activin and neutralizes its biological activities.

Culture cells treated with follistatin alone, at doses comprised between 10^{-12} M to 10^{-7} M, did not induce any significant variations in FSH β expression, and this, whatever the dose used (data not shown). The same observation was done on LH β expression.

When cells were treated with activin B and follistatin, the stimulatory effect of activin B on FSH β mRNA level was reduced. This inhibitory effect of follistatin on the activin stimulation of FSH β expression was dose dependant, high doses of follistatin being most efficient (treatment with 10^{-8} M activin B and 10^{-8} M follistatin: x 0.4, $P < 0.01$ as compared to activin B treatment alone (Figure 4). The effect of the combined treatments by activin B and follistatin on LH β expression was also investigated. After treatments and whatever the doses, no significant changes on LH β mRNA levels were observed as compared to control or activin B treated cells (Figure 4).

Effects of testosterone and activin B combined treatments on LH β expression (Figure 5)

In the above experiments activin B had a low inhibitory effect (significant or not according to the experiment) on basal LH β expression by eel pituitary cells. We supposed that this lack of effect was due to the low basal levels of LH β mRNA in control cells. To test this hypothesis and reveal activin inhibitory effect, we choose to work with pituitary cells having a stronger expression of LH β . Pituitary cells were treated with testosterone, which increased LH β expression (x 6 as compared to control, $P < 0.001$) in agreement with our previous study (Aroua et al, 2007). When cells received combined treatments by testosterone and activin B, the LH β mRNA stimulation induced by testosterone was reduced with a dose-dependent response to activin B concentration. In these cells, LH β mRNA levels significantly differed from testosterone treated cells

(testosterone + activin B 10^{-10} M treated cells: x 0.4, $P < 0.001$; testosterone + activin B 10^{-8} M treated cells: x 0.3, $P < 0.001$). When cells were treated with activin B alone, a significant decrease in LH β mRNA levels was observed as compared to control (x 0.4, $P < 0.05$) (Figure 5).

Discussion

In the present study, we investigated the potential role of the activin in the direct regulation of eel gonadotropin subunits, using primary culture of pituitary cells.

1. Distribution of activin and potential paracrine role

In the eel, we showed, using quantitative real time RT-PCR, the presence of activin mRNA in the organs/tissues of the gonadotropic axis : brain, pituitary and gonads. The detection of activin mRNA in the pituitary suggests a possible paracrine/autocrine role of this peptide.

In goldfish, using immunocytochemical staining (Ge et al., 1993), Northern-blot analysis and RT-PCR assay (Ge and Peter, 1994 ; Ge et al., 1997 ; Yam et al., 1999), expression of activin subunits was shown in a variety of tissues, including gonads, brain and pituitary. Another study in the grey mullet showed activin expression in these tissues (Mousa and Mousa, 2003). In addition, activin receptors were found to be also expressed in the goldfish pituitary (Yuen and Ge, 2004). These data suggested paracrine/autocrine roles for activin inside the pituitary.

In mammals, activin was also shown to be produced in the pituitary (human : Alexander et al., 1995 ; rat : Meunier et al., 1988 ; Roberts et al., 1989), suggesting a potential autocrine/paracrine function. In addition, the use of an activin B-specific monoclonal antibody in cultured pituitary cells significantly suppressed the basal secretion of FSH (rat: Corrigan et al., 1991; ovine: Baratta et al., 2001), demonstrating that the endogenous pituitary activin could serve as critical local factor for the control of gonadotropin expression and secretion.

In amphibians, immunocytochemical studies showed that activin/inhibin β B immunoreactivity was detected in gonadotropes (Xenopus : Uchiyama et al., 1996 ; bullfrog : Uchiyama et al., 2000).

In contrast to other vertebrates, avian anterior pituitary lacks the capacity for endogenous production of activins, as Lowell et al. (2005) reported absence of intrapituitary expression of

activin subunits in the domestic fowl using real-time quantitative PCR. In contrast, the avian ovary, like its mammalian counterpart, expresses activin (Davis and Johnson, 1998).

The paracrine/autocrine role of activin in the pituitary may be a conserved function during vertebrate (mammals, amphibians and teleosts) evolution, but other studies in birds are really needed to know whether or not activin is absent in the bird pituitary.

2. Activin stimulates the expression of FSH β subunit

Our results indicated that human recombinant activin B was able to strongly stimulate FSH β mRNA levels. This positive effect on FSH β expression was time-dependent, as longer duration of cell treatment (9 days) induced a higher increase in mRNA levels (x 13) than in short term cell treatment (4 days, x 4 as compared to control). In addition, activin B stimulation of FSH β mRNA was dose-dependent, with significant effects observed at a concentration of 10^{-10} M and with a maximal effect at the concentration 10^{-7} M. These observations are in agreement with recent results obtained in another teleost, the goldfish. Goldfish pituitary cells treated with homologous recombinant activin B, exhibited an increase in FSH β mRNA levels, and as in our works, the FSH β response to activin B was dose-dependent (Yam et al., 1999; Yuen and Ge, 2004). Authors have also shown that goldfish pituitary cells have almost the same response after treatment with human recombinant activin A (Yuen and Ge, 2004), indicating that various types of activin (human vs goldfish, A or B) are all potent on fish pituitary cells. In the present study, we used the human recombinant activin B, which exhibited a high potency on eel pituitary cells. Recombinant human activin A added to cultured pituitary cells also induced an increase in FSH β subunit mRNAs in tilapia (Yaron et al., 2001) and coho salmon (Davies et al, 2000).

Another study investigating the effect of activin on gonadotropins in a non-mammalian species showed a positive effect of activin B on FSH release by pituitary cells in the bullfrog (Uchiyama et al., 2000).

In mammals, the effects of activin on FSH secretion are mediated by rapid and substantial changes in steady state levels of FSH β mRNAs, as shown both *in vitro* (Carroll et al., 1989; Attardi and Miklos 1990; Weiss et al., 1992) and *in vivo* (Carroll et al., 1991a). Activin was found to activate transcription of the FSH β gene (Weiss et al., 1995). Studies on the stability of FSH mRNAs gave contradictory data, with stabilization (Carroll et al., 1991b) or alteration

(Attardi and Winters, 1993) of FSH β transcripts. Mutant mice lacking activins or activin type II receptor were generated and characterized (Matzuk et al., 1995). The majority of ACRII null mice demonstrated reduced pituitary, serum and mRNA FSH levels (Matzuk et al., 1995; Kumar et al., 2003).

The use of mouse L β T-2 cell line allowed to show that like rat and ovine promoters (Bailey et al., 2004; Huang et al., 2001; Pernasetti et al., 2001; Suszko et al., 2003), goldfish FSH β promoter was stimulated by activin (Lau and Ge, 2005).

Our results in an ancient teleost, the eel, indicate that the positive regulation exerted by activin directly on FSH would be an ancient regulation largely conserved in vertebrates, as it is encountered in fish, amphibian and mammals.

3. Specificity of activin effects on FSH β subunit: Interaction with follistatin

To assess the specificity of the stimulatory effect of activin B on FSH β expression, we performed experiments where cells were co-treated by activin and its binding protein, follistatin. In mammals, it was shown that follistatin is able to associate with the β subunits of activin to form the activin-follistatin complex made of one activin and two follistatin molecules. The formation of this complex inhibits the association of activin to its receptors (for review: Philips and de Kretser, 1998). Matzuk and colleagues (Guo et al., 1998) generated transgenic mouse lines overexpressing follistatin, which showed reproductive defects; surprisingly, only one of the five mouse lines was FSH concentrations depressed. Follistatin has been demonstrated to decrease FSH synthesis (Besecke et al., 1997; Carroll et al., 1989; Dalkin et al., 1996) and secretion (Robertson et al., 1990; Wang et al., 1990a, b; DePaolo et al., 1992; Besecke et al., 1997; monkey: Merrigida et al., 1994; ram: Tilbrook et al., 1995) through blockade of activin. Follistatin is able to decrease the stability of FSH β mRNA (Attardi and Winters, 1993). Early studies had documented that follistatin could suppress the effects of GnRH in stimulating FSH secretion (Robertson et al., 1990; Wang et al., 1990a, b), in part by the blockade of transcriptional activation of the GnRH receptor gene by activin (Fernandez-Vazquez et al., 1996).

In our experiment, we observed that recombinant human follistatin was able to significantly and dose-dependently reduce the stimulatory effect of activin on FSH β mRNA levels. Our results

in the eel are in agreement with those obtained in the goldfish in which recombinant human follistatin inhibited the stimulatory effect of recombinant goldfish activin on FSH β expression by pituitary cells (Yuen and Ge, 2004). Recombinant goldfish follistatin was shown to have the same effect as human follistatin in this species (Cheng et al, 2007).

Follistatin was also cloned in the zebrafish (Bauer et al., 1998), catfish (Gregory et al., 2004), goldfish (Cheng et al., 2007) and sea bream (Funkenstein et al., 2008), and the high sequence identity observed among species suggests conserved functions of this protein in vertebrates. As in mammals (Kaiser et al., 1992; Lee et al., 1993), follistatin expression was reported in the pituitary of goldfish (Yuen and Ge, 2004).

These and our studies indicate the existence of a activin-follistatin system involved in the regulation of FSH in teleosts as in mammals, which may be conserved during vertebrate evolution.

4. Activin inhibits the expression of LH β subunit

We observed that activin B tended to induce a decrease in basal LH β expression in eel pituitary cells but this effect was not always significant and the dose-response was not clearly established. To confirm the inhibitory effect of activin B on LH β expression in eel, we choose to work on pituitary cells expressing high LH β levels. We demonstrated in our previous work that LH β expression could be stimulated by androgen treatment (Aroua et al, 2007). Then, we choose to perform combined treatment with an androgen, testosterone (T), and activin B. The result of this experiment has permitted to confirm the inhibitory action of activin B on eel LH β expression and show a dose-dependent response.

An inhibitory effect of activin on LH β expression was also indicated in goldfish after treatments of pituitary cells by goldfish recombinant activin B or human recombinant activin A (Yam et al, 1999; Yuen and Ge, 2004). In contrast, preliminary studies in tilapia and coho salmon did not report such an inhibitory regulation of LH by activin. Recombinant human activin A added to tilapia cultured pituitary cells induced an increase in LH β subunit mRNAs (Yaron et al., 2001), whereas in coho salmon, recombinant human activin A had no effect on LH β mRNAs *in vitro* (Davies et al, 2000). In the study of Davies and collaborators, the use of immature salmon males, in which LH β mRNA did not increase even in response to GnRH (Dickey and Swanson,

2000), may explain the lack of effect of activin on LH. These discrepancies may also be explained by teleost species-differences. Further investigations in other teleost species are therefore needed in order to better understand activin regulation of fish gonadotropins.

These observations contrast with the classical functions of activin described in mammals where the main effects concerned FSH expression, synthesis and secretion, with no direct modulation of LH (for review: Peng and Mukai, 2000). In mammals, the presence of activins and their receptor subtypes in the hypothalamic regions containing GnRH-secreting neurons (Cameron et al., 1994; Roberts et al., 1996) suggested that activins may regulate reproductive function by modulating, not only pituitary FSH, but also hypothalamic GnRH. Indeed, various *in vitro* studies in mammals have documented the roles of activins and their signaling through activin receptor II in GnRH release and biosynthesis in hypothalamic explants (Calogero et al., 1998; MacConell et al., 1999) or neuronal cell lines (GT1-7 cells: Gonzalez-Manchon et al., 1991; MacConell et al., 1999). Activin can also modulate GnRH receptor synthesis/expression on the pituitary gonadotropes (Braden and Conn, 1992) and activate the transcription of GnRH receptor gene in α T3-1 cells (Fernandez-Vasquez et al., 1996). Accordingly, the presence of an activin response element was evidenced in the promoter of murine GnRH receptor (Norwitz et al., 2002). Castrated knockout mice lacking activin receptor II presented no changes in hypothalamic synthesis of GnRH peptide, nor in expression of GnRH receptors in the anterior pituitary (Kumar et al., 2003). *In vitro* reports in rat demonstrated that activin could affect LH secretion indirectly by enhancing GnRH-stimulated release of LH (Weiss et al., 1993). A study on sheep pituitary cells reported that activin-A induced a dose-dependent suppression of GnRH-induced LH release (Muttukrishna and Knight, 1991).

The opposite effect exerted by activin on eel and goldfish gonadotropin expression contrasts also with observations in amphibians, in which treatment with human recombinant activin B of bullfrog pituitary cells induced an increase of both FSH and LH secretion (Uchiyama et al, 2000).

Our results in the eel, together with those in the goldfish, suggest that the direct inhibitory effect of activin on LH β expression may be a teleost-specific regulation, which has not been conserved in other vertebrates. Studies in other teleost species are needed to confirm this hypothesis of a differential gonadotropin regulation by activin.

In conclusion, in the present study, we demonstrate the direct effects of activin on eel gonadotropin expression : stimulatory on FSH β and inhibitory on LH β . The distribution study by qPCR reveals that activin β_B subunit is expressed in many tissues including organs of the reproductive axis (brain-pituitary-gonads). The fact that activin is expressed in pituitary cells permits to suggest that activin could act locally as an autocrine/paracrine factor in the differential regulation of gonadotropin subunits. In addition, follistatin is able to suppress activin effect on FSH β . This finding in the eel, a representative of a phylogenetically ancient group of teleost, indicates that the role of the activin/follistatin system in gonadotropin regulation may be conserved among vertebrates.

Acknowledgements

References

Alexander, J.M., Swearingen, B., Tindall, G.T., Klibanski A., 1995. Human pituitary adenomas express endogenous inhibin subunit and follistatin messenger ribonucleic acids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 147-152.

Aroua, S., Schmitz, M., Baloche, S., Vidal, B., Rousseau, K., Dufour, S., 2005. Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 82, 221-232.

Aroua S, Weltzien F-A, Le Belle N, Dufour S, 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 333–343.

Asashima, M., Nakano, H., Uchiyama, H., Sugino, H., Nakamura, T., Eto, Y., Ejima, D., Davids, M., Plessow, S., Cichocka, I., Kinoshita, K., 1991. Follistatin inhibits the mesoderm-inducing

activity of activin-A and the vegetalizing factor from chicken embryo. *Roux's Arch Dev Biol* 200, 4-7.

Attardi, B., Miklos, J., 1990. Rapid stimulatory effect of activin-A on messenger RNA encoding the follicle-stimulating hormone beta-subunit in rat pituitary cell cultures. *Mol. Endocrinol.* 4, 721-726.

Attardi, B., Winters, S.J., 1993. Decay of follicle-stimulating hormone- β messenger RNA in the presence of transcriptional inhibitors and/or inhibin, activin, or follistatin. *Mol. Endocrinol.* 7, 668-680.

Bailey JS, Rave-Harel N, McGillivray SM, Coss D, Mellon PL. 2004. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene involves Smads and the TALE homeodomain proteins Pbx1 and Prep1. *Mol. Endocrinol.* 18, 1158-70.

Baratta M, West LA, Turzillo AM, Nett TM. 2001. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. *Biol. Reprod.* 64, 714-9.

Bauer, H., Meier, A., Hild, M., Stachel, S., Economides, A., Hazelett, D., Harland, R.M., Hammerschmidt, M., 1998. Follistatin and noggin are excluded from the zebrafish organizer. *Dev. Biol.* 204, 488-507.

Besecke LM, Guendner MJ, Sluss PA, Polak AG, Woodruff TK, Jameson JL, Bauer-Dantoin AC, Weiss J. 1997. Pituitary follistatin regulates activin-mediated production of follicle-stimulating hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 138 2841-2848.

Bilezikjian, L.M., Vaughan, J.M., Vale, W.W., 1993. Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology.* 133, 2545-2553.

Braden, T.D., Conn, P.M., 1992. Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 130, 2101-2105.

Calogero, A.E., Burrello, N., Ossino, A.M., Polosa, P., D'Agata, R., 1998. Activin-A stimulates gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and follistatin. *J. Endocrinol.* 156, 269-274.

Cameron, V.A., Nishimura, E., Mathews, L.S., Lewis, K.A., Sawchenko, P.E., Vale, W.W., 1994. Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 134, 799-808.

Carroll, R.S., Corrigan, A.Z., Gharib, S.D., Vale, W., Chin, W.W., 1989. Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Mol. Endocrinol.* 3, 1969-1976.

Carroll, R.S., Kowash, P.M., Lofgren, J.A., Schwall, R.H., Chin, W.W. 1991a. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology* 129, 3299-3304.

Carroll, R.S., Corrigan, A.Z., Vale, W., Chin, W.W., 1991b. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 129, 1721-1726.

Cheng, G.F.Y., Yuen, C-W., Ge, W., 2007. Evidence for the existence of a local activin-follistatin negative feedback loop in the goldfish pituitary and its regulation by activin and gonadal steroids. *J. Endocrinol.* 195, 373-384.

Corrigan, A.Z., Bilezikjian, L.M., Carroll, R.S., Bald, L.N., Schmelzer, C.H., Fendly, B.M., Mason, A.J., Chin, WW., Schwall, R.H., Vale, W., 1991. Evidence for an autocrine role of activin B within anterior cultures. *Endocrinology* 128, 1682-1684.

Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Yasin, M., Gilrain, J.T., Marshall, J.C., 1996. Pituitary activin receptor subtypes and follistatin gene expression in female rats: differential regulation by activin and follistatin. *Endocrinology* 137, 548-554.

Davies, B., Dickey, J., Swanson, P., 2000. Regulation of FSH (GTH I) and LH (GTH II) in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): the action of recombinant human activin and a salmon testis extract. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Bergen, 1999. University of Bergen, Bergen, p. 486.

Davis, A.J., Johnson, P.A., 1998. Expression pattern of messenger ribonucleic acid for follistatin and the inhibin/activin subunits during follicular and testicular development in *Gallus domesticus*. *Biol. Reprod.* 59, 271-277.

DePaolo LV, Shimonaka M, Ling N. 1992. Regulation of pulsatile gonadotropin secretion by estrogen, inhibin, and follistatin (activin-binding protein) in ovariectomized rats. *Biol. Reprod.* 46, 898-904.

De Pinna MCC, 1996. Teleostean monophyly; in Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD (eds): *Interrelationships of Fishes*. New York, Academic press, pp 147-162.

Dickey JT, Swanson P. 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol.* 118, 436-49.

Dufour S, Burzawa-Gerard E, Le Belle N, Sbaihi M, Vidal B, 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*; in Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds): *Eel Biology*. Tokyo, Springer, pp 373-383.

Dufour S, Weltzien F-A, Sébert M-E, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C, 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040, 9-22.

Esch, F.S., Shimasaki, S., Mercado, M., Cooksey, K., Ling, N., Ying, S., Ueno, N., Guillemin, R., 1987. Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol Endocrinol.* 1, 849-55.

Fernández-Vázquez G, Kaiser UB, Albarracin CT, Chin WW. 1996. Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol Endocrinol.* 10, 356-66.

Funkenstein, B., Rebhan, Y., Skopal, T., 2008. Molecular cloning and characterization of follistatin in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Mol. Biol. Rep.* In press

Ge, W., Chang, J.P., Peter, R.E., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W., 1992. Effects of porcine follicular fluid, inhibin-A, and activin-A on goldfish gonadotropin release *in vitro*. *Endocrinology* 131, 1922-1929.

Ge, W., Cook, H., Peter, R.E., Vaughan, J., Vale, W., 1993. Immunocytochemical evidence for the presence of inhibin and activin-like proteins and their localization in goldfish gonads. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89, 333-340.

Ge, W., Peter, R.E. 1994. Activin-like peptides in somatotrophs and activin stimulation of growth hormone release in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 213-221.

Ge, W., Miura, T., Kobayashi, H., Peter, R.E., Nagahama, Y., 1997. Cloning of cDNA for goldfish activin beta B subunit, and the expression of its mRNA in gonadal and non-gonadal tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 37-45.

Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., Chin, W.W., 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr. Rev.* 11, 177-199.

Gonzalez-Manchon, C., Bilezikjian, L.M., Corrigan, A.Z., Mellon, P.L., Vale, W., 1991. Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 54, 373-377.

Gregory, S.J., Kaiser, U.B., 2004. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin Reprod Med.* 22, 253-67.

Gregory, D.J., Waldbieser, G.C., Bosworth, B.G., 2004. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. *Anim. Genet.* 35, 425-430.

Guo, Q., Kumar, T.R., Woodruff, T., Hadsell, L.A., DeMayo, F.J., Matzuk, M.M., 1998. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 12, 96-106.

Huang HJ, Sebastian J, Strahl BD, Wu JC, Miller WL. 2001. Transcriptional regulation of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by activin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of two proximal activator protein-1 sites for GnRH stimulation. *Endocrinology* 142, 2267-74.

Kaiser, U.B., Lee, B.L., Carroll, R.S., Unabia, G., Chin, W.W., Childs, G.V., 1992. Follistatin gene expression in the pituitary: localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology* 130, 3048-3056.

Kogawa, K., Nakamura, T., Sugino, K., Takio, K., Titani, K., Sugino, H., 1991. Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology* 128,1434-40.

Kumar, T.R., Agno, J., Janovick, J.A., Conn, P.M., Matzuk, M.M., 2003. Regulation of FSH β and GnRH receptor gene expression in activin receptor II knockout male mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 212, 19-27.

Lau, M-T., Ge, W., 2005. Cloning of Smad2, Smad3, Smad4, and Smad7 from the goldfish pituitary and evidence for their involvement in activin regulation of goldfish FSH β promoter activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 22-38.

Lee, B.L., Unabia, G., Childs, G., 1993. Expression of follistatin mRNA by somatotropes and

mammotropes early in the rat estrous cycle. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 955-960.

Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., Guillemin, R., 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321, 779-782.

Lowell, T.M., Knight, P.G., Gladwell, R.T., 2005. Variation in pituitary expression of mRNAs encoding the putative inhibin co-receptor (betaglycan) and type-I and type-II activin receptors during the chicken ovulatory cycle. *J. Endocrinol.* 186, 447-455.

MacConell, L.A., Lawson, M.A., Mellon, P.L., Roberts, V.J., 1999. Activin A regulation of gonadotropin-releasing hormone synthesis and release in vitro. *Neuroendocrinology* 70, 246-254.

Matzuk, M.M., Kumar, T.R., Bradley, A., 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374, 356-360.

Meriggiola, M.C., Dahl, K.D., Mather, J.P., Bremner, W.J., 1994. Follistatin decreases activin-stimulated FSH secretion with no effect on GnRH-stimulated FSH secretion in prepubertal male monkeys. *Endocrinology* 134, 1967-1970.

Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M., Vale, W., 1988. Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A, and β B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 247-251.

Miura, C., Miura, T., Kudo, N., Yamashita, M., Yamauchi, K., 1999. cDNA cloning of a stage-specific dependent gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Devlop. Growth Differ.* 41, 463-471.

Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Fukuda, M., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K., Matsuo, H., 1985. Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem Biophys Res Commun.* 129, 396-403.

Montero M, Le Belle N, Vidal B, Dufour S, 1996. Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *Gen Comp Endocrinol* 104 103–115.

Mousa, M.A., Mousa, S.A., 2003. Immunohistochemical localization of inhibin and activin-like proteins in the brain, pituitary gland, and the ovary of thin-lipped grey mullet, *Liza ramada* (Risso). *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 434-443.

Muttukrishna, S., Knight, P.G., 1991. Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* 6, 171-178.

Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., Sugino, H., 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247, 836-838.

Norwitz, E.R., Xu, S., Jeong, K.H., Bedecarrats, G.Y., Winebrenner, L.D., Chin, W.W., Kaiser, U.B., 2002. Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH-receptor gene. *Endocrinology* 143, 985-997.

Peng C, Mukai ST. 2000. Activins and their receptors in female reproduction. *Biochem Cell Biol.* 78, 261-79.

Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang HJ, Miller WL, Mellon PL. 2001. Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142, 2284-95.

Phillips, D.J., de Kretser, D.M., 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front. Neuroendocrinol.* 19, 287-322.

Quérat, B., Moumni, M., Jutisz, M., Fontaine, Y.A., Counis, R., 1990. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative β subunit of the type-II gonadotrophin from the European eel. *J. Mol. Endocrinol.* 4, 257-264.

Rivier, J., Spiess, J., McClintock, R., Vaughan, J., Vale, W., 1985. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 133, 120-7.

Roberts, V., Meunier, H., Vaughan, J., Rivier, J., Rivier, C., Vale, W., Sawchenko, P., 1989. Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 124, 552-554.

Roberts, V.J., Barth, S.L., Meunier, H., Vale, W., 1996. Hybridization histochemical and immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits and messenger ribonucleic acids in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 364, 473-493.

Robertson, D.M., Foulds, L.M., Leversha, L., Morgan, F.J., Hearn, M.T., Burger, H.G., Wettenhall, R.E., de Kretser, D.M., 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 126, 220-6.

Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM., 1987. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun.* 149, 744-9.

Robertson, D.M., Farnworth, P.G., Clarke, L., Jacobsen, J., Cahir, N.F., Burger, H.G., de Kretser, D.M., 1990. Effects of bovine 35 kDa FSH-suppressing protein on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: comparison with bovine 31 kDa inhibin. *J. Endocrinol.* 124, 417-423.

Schmitz M, Aroua S, Vidal B, Le Belle N, Elie P, Dufour S: Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 2005; 81: 107-119.

Shukovski, L., Findlay, J.K., Robertson, D.M., 1991. The effect of follicle-stimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells *in vitro* and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology* 129, 3395-3402.

Stone R, 2003. Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* 302 221-222.

Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK. 2003. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Mol. Endocrinol.* 17, 318-32.

Tilbrook, A.J., Clarke, I.J., de Kretser, D.M., 1995. Human recombinant follistatin-288 suppresses plasma concentrations of follicle-stimulating hormone but is not a significant regulator of luteinizing hormone in castrated rams. *Biol. Reprod.* 53, 1353-1358.

Uchiyama, H., Komazaki, S., Asashima, M., Kikuyama, S., 1996. Occurrence of immunoreactive activin/inhibin beta(B) in gonadotrophs, thyrotrophs, and somatotrophs of the *Xenopus* pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 1-10.

Uchiyama, H., Koda, A., Komazaki, S., Oyama, M., Kikuyama, S., 2000. Occurrence of immunoreactive activin/inhibin beta(B) in thyrotropes and gonadotropes in the bullfrog pituitary: possible paracrine/autocrine effects of activin B on gonadotropin secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 68-76.

Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R., 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84, 8282-8286.

Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., Spiess, J., 1986. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321, 776-779.

Vale, W., Rivier, C., Hsueh, A., Campen, C, Meunier, H., Bicsak, T. et al., 1988. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Progress in Hormone Research* 44, 1-34.

Wang, Q.F., Farnworth, P.G., Findlay, J.K., Burger, H.G., 1990a. Chronic inhibitory effect of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP) or follistatin on activin- and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH synthesis and secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 127, 1385-1393.

Wang, Q.F., Farnworth, P.G., Burger, H.G., Findlay, J.K., 1990b. Acute inhibitory effect of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP) on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 72, 33-42.

Weiss, J., Crowley Jr., W.F., Halvorson, L.M., Jameson, J.L., 1993. Perfusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology* 132, 2307-2311.

Weiss, J., Guendner, M.J., Halvorson, L.M., Jameson, J.L., 1995. Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology* 136, 1885-1891.

Weiss, J., Harris, P.E., Halvorson, L.M., Crowley Jr., W.F., Jameson, J.L., 1992. Dynamic regulation of follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels by activin and gonadotropin-releasing hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 131, 1403-1408.

Weltzien FA, Pasqualini C, Vernier P, Dufour S.A., 2005. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 134-42.

Xiao, S., Findlay, J.K., 1991. Interactions between activin and FSH-suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79, 99-107.

Xiao, S., Farnworth, P.G., Findlay, J.K., 1992a. Interaction between activin and follicle-stimulating hormone-suppressing protein/follistatin in the regulation of basal inhibin production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131, 2365-2370.

Xiao, S., Robertson, D.M., Findlay, J.K. 1992b. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*

Yam, K.M., Yu, K.L., Ge, W., 1999. Cloning and characterisation of goldfish activin betaA subunit. *Gen. Comp. Endocrinol.* 154, 45-54.

Yaron, Z., Gur, G, Melamed, P., Rosenfeld, H., Levavi-Sivan, B., Elizur, A., 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Comp. Biochem. Physiol* 129B, 489-502.

Ying, S.Y., 1988 Inhibins, activins, and follistatins : gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr. Rev.* 9, 267-293.

Yuen, C-W., Ge, W., 2004. Follistatin suppresses FSH β but increases LH β expression in the goldfish-evidence for an activin-mediated autocrine/paracrine system in fish pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 108-115.

Figure legends

Figure 1. Tissue distribution of activin in eel. Activin mRNAs were assayed by quantitative real-time RT-PCR on pools of various tissues: brain, pituitary, gonads, muscle and liver. Brain was dissected in two parts: part A comprised olfactory bulbs, telencephalon and diencephalon, and part B corpus cerebellum and medulla oblongata. Data are normalized to eel ARP.

Figure 2. Kinetics of FSH β and LH β expression in the absence (control) or presence of human recombinant activin B. Pituitary cell cultures were treated with 10^{-8} M of human recombinant activin B. Cultures were stopped at day 4 (D4) and day 9 (D9) to measure FSH β (A) and LH β (B) by qRT-PCR. Data are normalized to eel ARP. Means are given \pm SEM (n= 4-well/group; 50,000 cells/well). *** $P < 0.001$ versus control, ANOVA.

Figure 3. Dose-dependent effects of human recombinant activin B on FSH β and LH β expression by eel pituitary cells. Cells were treated 9 days and mRNA levels for FSH β and LH β subunits quantified by qRT-PCR. Data are normalized to eel ARP. Means are given \pm SEM (n= 4-well/group ; 50,000 cells/well). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control, ANOVA.

Figure 4. Dose-dependent effects of combined treatments with human recombinant activin B and follistatin on FSH β and LH β expression by eel pituitary cells. Cells were treated 9 days and mRNA levels for FSH β (A) and LH β (B) subunits quantified by qRT-PCR. Data are normalized to eel ARP. Means are given \pm SEM (n= 4-well/group ; 50,000 cells/well). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control, ANOVA.

Figure 5. Dose-dependent effects of combined treatment with T and human recombinant activin B on LH β expression by eel pituitary cells. Cells were treated 9 days and mRNA levels for LH β subunits quantified by qRT-PCR. Data are normalized to eel ARP. Means are given \pm SEM (n= 4-well/group; 50,000 cells/well). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus control, ANOVA.

Fig re 1

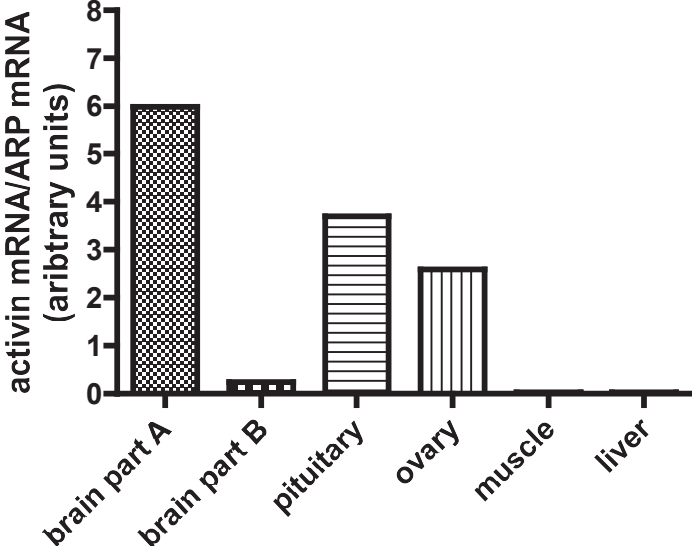
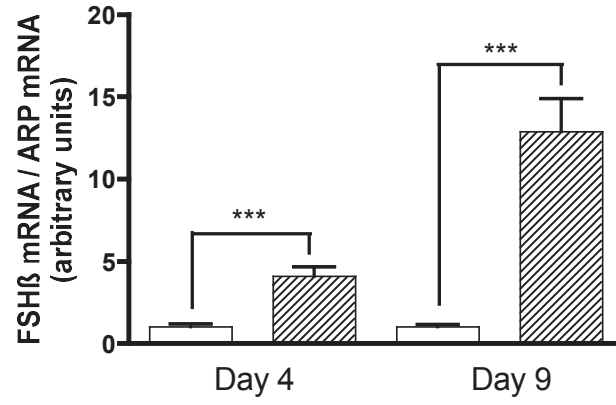


Fig re 2

A) FSH β



B) LH β

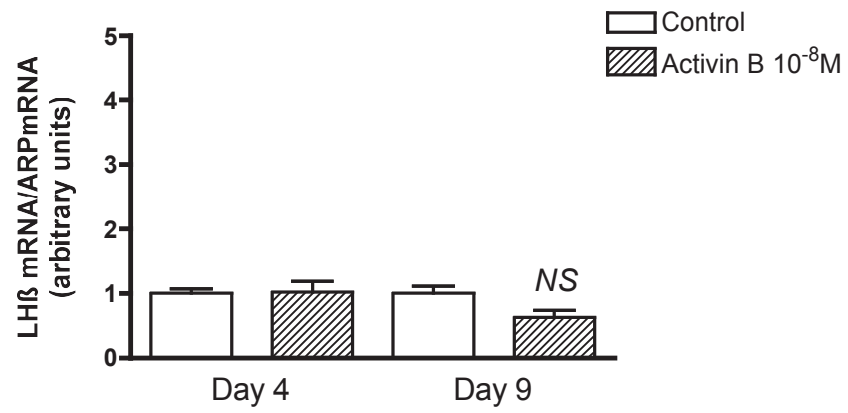


Fig re 3

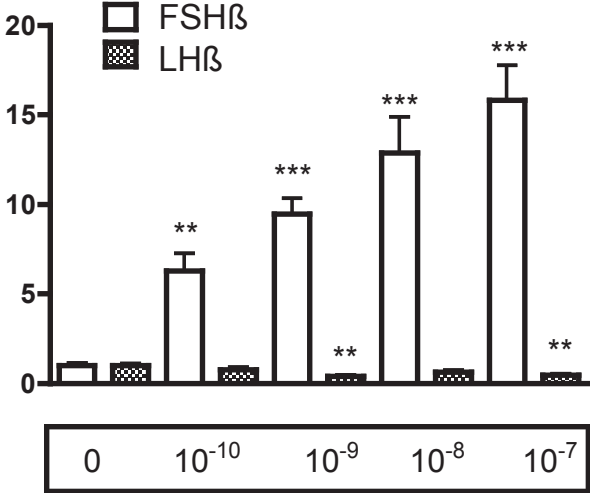
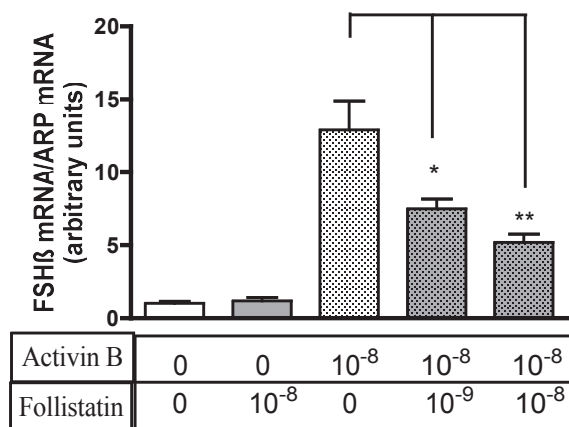


Fig re 4

A) FSH β



B) LH β

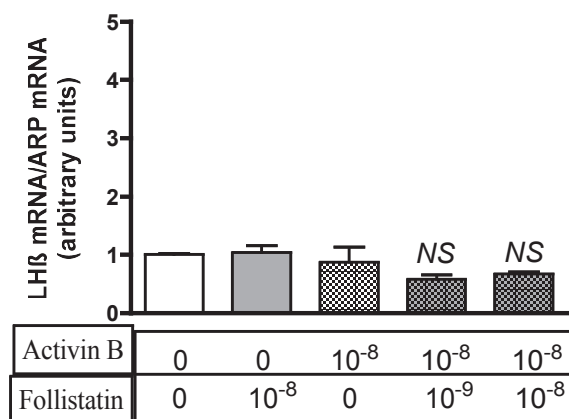
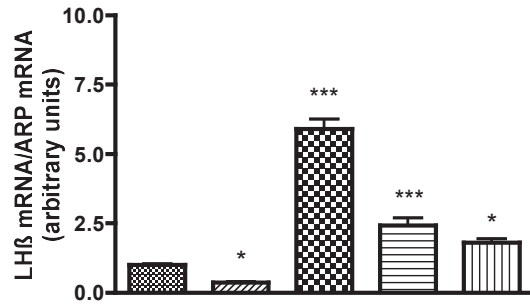


Fig re 5



Testosterone	0	0	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
Activin B	0	10^{-8}	0	10^{-10}	10^{-8}

5. Etudes complémentaires : Effets d'hormones métaboliques sur l'expression des gonadotropines

Afin d'étudier le rôle possible de différentes hormones métaboliques dans la régulation différentielle de l'expression des gonadotropines, nous avons recherché leurs effets directs sur les cellules hypophysaires d'anguilles en culture primaire. Les facteurs étudiés sont un facteur de croissance (Insulin-like growth factor 1, IGF-1), une hormone du métabolisme lipidique (leptine) et un corticostéroïde (Cortisol). Des données sur leurs effets sur la LH chez l'anguille européenne ont déjà été obtenues dans notre laboratoire (Huang et al, 1998 ; 1999), mais aucune information n'était disponible en ce qui concerne la FSH.

Dans les expériences qui suivent, nous avons en parallèle testé l'effet des stéroïdes sexuels pour vérifier le bon fonctionnement des cellules et leur capacité de réponse (E2 pour la stimulation de FSH β et T pour la stimulation de LH β ; cf article 3). L'expression des sous-unités LH β et FSH β a été mesurée par PCR quantitative en temps réel.

5.1. Effets de l'IGF-1 sur l'expression des sous-unités des gonadotropines

Nous avons recherché l'effet de l'IGF-1 recombinant humain. Trois doses d'IGF-1 recombinant humain ont été utilisées (10^{-11} M, 10^{-9} M et 10^{-7} M).

Les traitements par l'IGF-1 à faibles concentrations (10^{-11} M et 10^{-9} M) n'induisent pas de modifications de l'expression de la sous-unité LH β . En revanche, une augmentation significative des taux d'ARNm codant pour LH β est observée dans les cellules traitées par l'IGF-1 à la concentration 10^{-7} M (x 2.3 comparé aux témoins, $P < 0.05$). Dans cette expérience, T (10^{-8} M) est capable de fortement stimuler l'expression de la sous-unité LH β (x 8 comparé aux témoins, $P < 0.001$), par contre E₂ (10^{-8} M) n'a pas d'effet significatif (Figure 10A).

Concernant la sous-unité FSH β , aucune variation significative n'est observée après les traitements par l'IGF-1 et ce quelle que soit la dose de l'IGF-1. En revanche, une forte stimulation de l'expression de FSH β est observée après des traitements par E₂ (x 5 comparé aux témoins, $P < 0.001$). Les traitements par T n'induisent pas de variations de l'expression de FSH β (Figure 10B).

Ces résultats indiquent que l'IGF-1 peut intervenir dans la régulation différentielle des deux gonadotropines. En effet, l'IGF-1 qui ne montre pas d'effets directs hypophysaires sur

l'expression de la sous-unité FSH β , est par contre capable de stimuler directement au niveau hypophysaire l'expression de la sous-unité LH β . L'effet positif de l'IGF-1 sur l'expression de LH β est en accord avec les travaux antérieurs montrant une stimulation *in vitro* de la synthèse de LH mesurée par RIA (Huang et al, 1998).

5.2. Effets de la leptine sur l'expression des sous-unités des gonadotropines

Nous avons recherché l'effet de la leptine recombinante humaine. Deux doses de leptine (10^{-8} M et 10^{-6} M) ont été testées pour leurs effets directs sur l'expression des sous-unités des gonadotropines.

Les traitements par la leptine n'ont pas produit d'effets significatifs sur l'expression des deux sous-unités LH β et FSH β et cela quelle que soit la dose testée (Figure 11).

Ces résultats suggèrent que la leptine n'a pas d'effets directs sur l'expression des gonadotropines.

5.3. Effets du cortisol et des combinaisons cortisol – stéroïdes sexuels sur l'expression des sous-unités des gonadotropines

Afin d'évaluer les effets directs hypophysaires du cortisol (F) et ses interactions potentielles avec les stéroïdes sexuels sur l'expression des sous-unités LH β et FSH β des gonadotropines, des cellules hypophysaires en culture primaire ont reçu des traitements par les stéroïdes seuls (E₂, T, DHT, F) ou par des combinaisons (F+E₂, F+T, F+DHT). Les hormones ont été utilisées à la concentration finale 10^{-7} M.

Comme dans les expériences précédentes (Article 3 et § 5.1), le traitement par E₂ n'induit pas de variation significative de l'expression de LH β ; en revanche, de fortes stimulations de l'expression de la sous-unité LH β sont observées après les traitements par les androgènes (T : x 8.6 et DHT : x 7.2 comparés aux témoins, $P < 0.01$). Le cortisol induit également une forte stimulation de l'expression de LH β (x 10 comparé aux témoins, $P < 0.01$). Lorsque les cellules sont traitées par les combinaisons F+T ou F+DHT, les taux d'ARNm codant pour la sous-unité LH β sont très fortement augmentés par rapport aux témoins (F+T : x 28.7, $P < 0.001$; F+DHT : x 27.6, $P < 0.001$; comparé aux témoins) mais également par rapport aux effets des stéroïdes seuls ($P < 0.001$) (Figure 12A).

Concernant FSH β , seuls les traitements par E₂ et par la combinaison F+E₂ montrent des effets positifs significatifs sur les taux en ARNm de cette sous-unité (E₂ : x 3.3 comparé aux témoins, $P < 0.001$; F+E₂ : x 2 comparé aux témoins, $P < 0.01$). Les autres traitements (T, DHT, F, F+T, F+DHT) ne montrent pas d'effets significatifs sur l'expression de la sous-unité FSH β (Figure 12B).

Ces résultats indiquent que le cortisol est capable de jouer un rôle dans la régulation différentielle des gonadotropines, étant capable de stimuler l'expression de la LH β alors qu'il ne montre pas d'effet direct sur le contrôle de l'expression de la FSH β . De plus, ces résultats montrent que F et les androgènes sont capables d'agir en synergie directement au niveau hypophysaire pour stimuler l'expression de LH β .

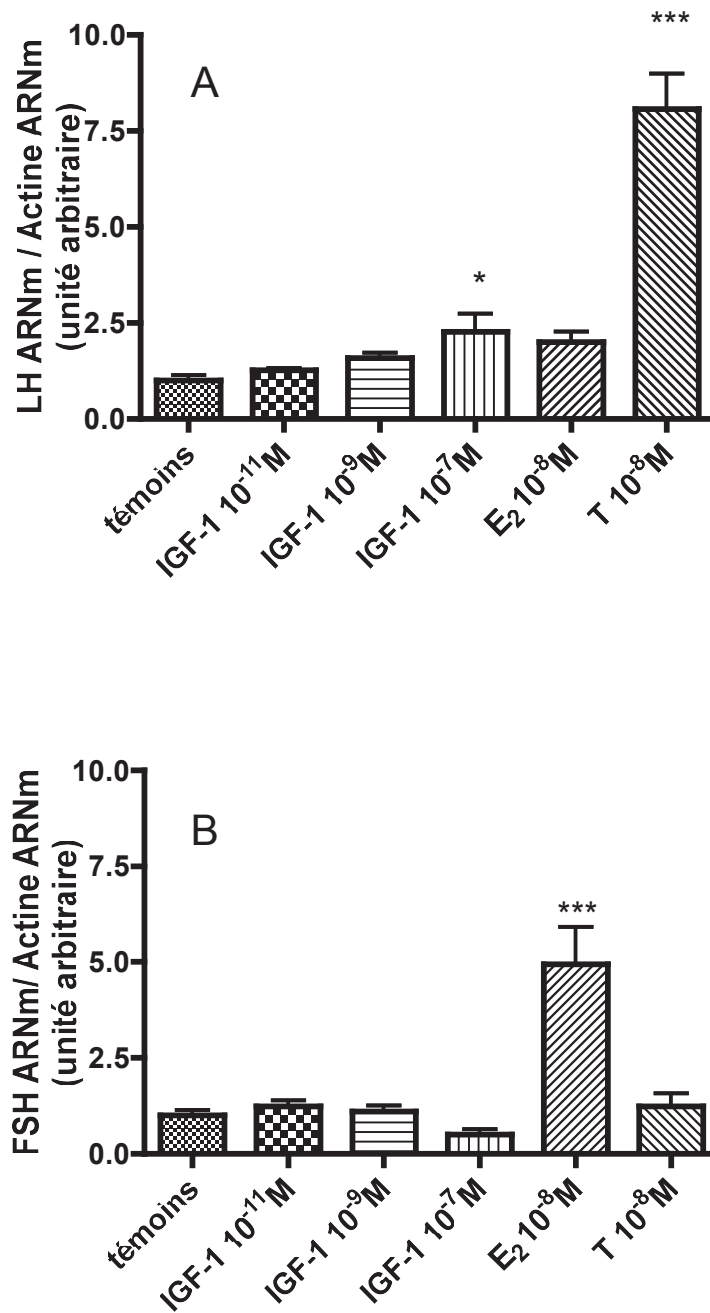


Figure 10 : Effets de l'IGF-1 sur l'expression des sous-unités A) LH β et B) FSH β des gonadotropines sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille. L'expression des ARNm a été mesurée par qrtRT-PCR et les résultats normalisés à l'aide de l'actine. Les moyennes sont données \pm SEM. * $P < 0.05$, * $P < 0.001$ comparé aux témoins, ANOVA.**

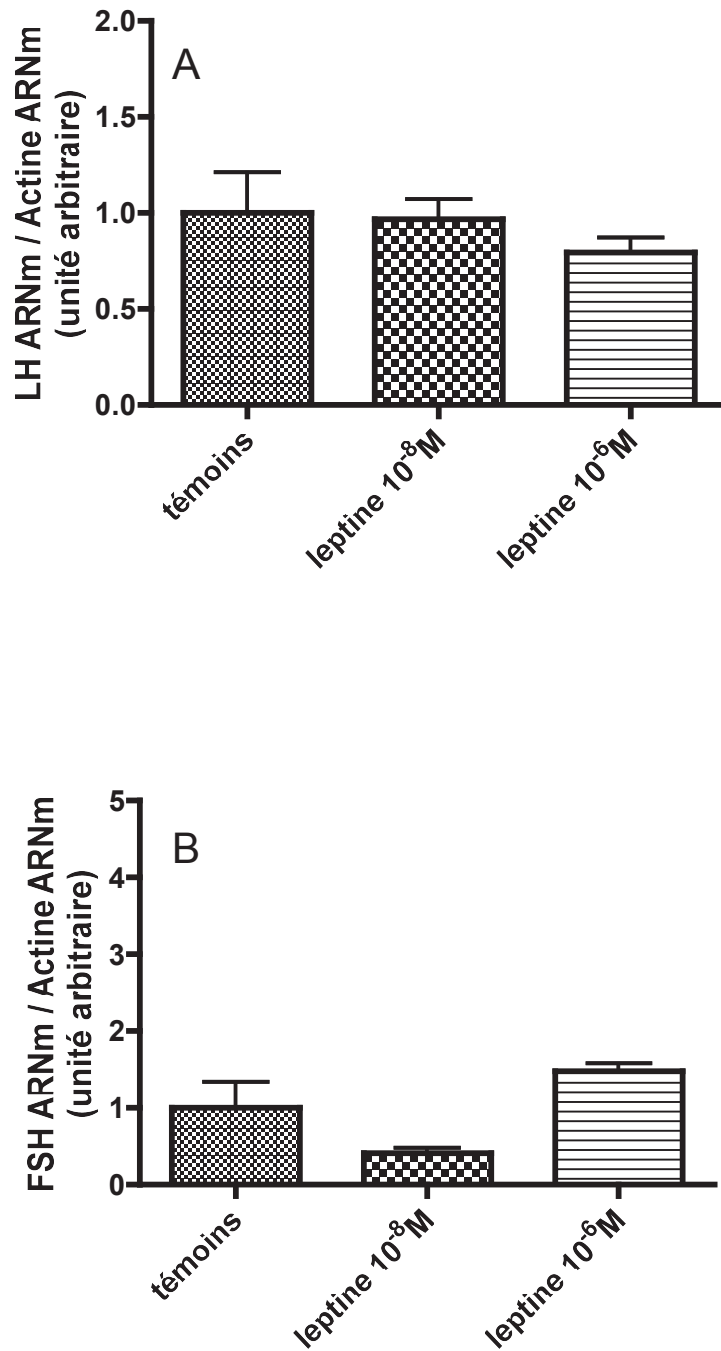


Figure 11: Effets de la leptine sur l'expression des sous-unités A) LH β et B) FSH β des gonadotropines sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille. L'expression des ARNm a été mesurée par qrtRT-PCR et les résultats normalisés à l'aide de l'actine. Les moyennes sont données \pm SEM, ANOVA.

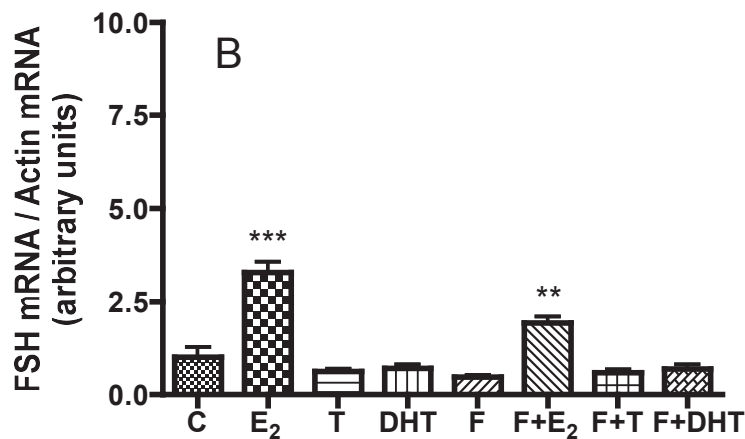
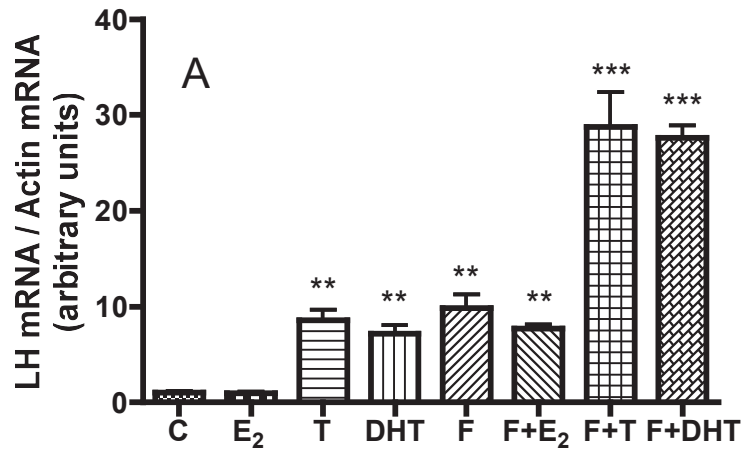


Figure 12: Effets du cortisol et des traitements combinés cortisol – stéroïdes sexuels sur l'expression des sous-unités A) LH β et B) FSH β des gonadotropines sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille. L'expression des ARNm a été mesurée par qrtRT-PCR et les résultats normalisés à l'aide de l'actine. Les moyennes sont données \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparé aux témoins, ANOVA.

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Développement de nouveaux outils pour l'étude des gonadotropines chez l'anguille européenne

1.1. Clonage de la sous-unité FSH β et dualité des gonadotropines.

La présence de deux gonadotropines a été mise en évidence chez les mammifères avec la séparation de deux fractions à partir de lobes antérieurs d'hypophyses capables pour l'une de stimuler la phase folliculaire, pour l'autre de stimuler la lutéinisation après injection chez des rats (Fevold et al, 1931). Elles ont, par la suite, été isolées et leur structure hétérodimérique a été caractérisée chez le mouton par Papkoff et Samy (1967). Enfin, les différentes sous-unités ont été clonées chez différentes espèces mammaliennes (pour revue : Counis, 1990).

Chez les téléostéens, des tentatives de purification d'hormones gonadotropes ont été entreprises chez quelques espèces à partir des années 60 (Gardon : Breton, 1968 ; Saumon : Yamazaki et Donaldson, 1968) et la première gonadotropine hypophysaire a été obtenue par Burzawa-Gerard (1971) chez la carpe, *Cyprinus carpio*. L'extrait hypophysaire obtenu ayant une forte activité gonadotrope et étant capable d'induire à la fois la gamétogenèse et la stéroïdogénèse chez différentes espèces de téléostéens aussi bien *in vivo* que *in vitro* (poisson rouge, *Carassius auratus* ; poisson-chat, *Heteropneustes fossilis* ; saumon, *Oncorhynchus tsawytscha* ; pour revue : Fontaine et Burzawa-Gerard, 1978), l'hypothèse de l'existence d'une seule gonadotropine hypophysaire (GTH) chez les téléostéens a été émise. La séquence peptidique partielle puis le clonage de cette hormone chez un certain nombre de téléostéen, l'apparentait davantage au type LH qu'au type FSH des mammifères.

La mise en évidence de la dualité des gonadotropines est donc relativement récente chez les téléostéens. Elle est démontrée par Suzuki et ses collaborateurs (1988a,b) qui, chez le

saumon keta (*Oncorhynchus keta*), ont réussi à isoler et caractériser deux gonadotropines distinctes nommées GTH I et GTH II en référence à leurs fractions d'éluion. Par la suite, l'analyse des séquences nucléotidiques des gènes codant pour les gonadotropines des téléostéens a permis d'établir leur homologie avec celles des mammifères et d'en adopter la nomenclature (GTH-I : FSH et GTH-II : LH ; Li et Ford, 1998).

De nombreux travaux ont ainsi révélé la présence de l'hormone FSH chez différentes espèces de téléostéens (tambour brésilien, *Micropogonias undulatus*: Copeland et al, 1993; bonite, *Katsuwonus pelamis*: Koide et al, 1993; daurade japonaise, *Pagrus major*: Tanaka et al, 1993; thon, *Thunnus obesus*: Okada et al, 1994; bar américain, *Morone saxatilis*: Hassin et al, 1995; daurade royale, *Sparus aurata*: Elizur et al, 1996; poisson rouge, *Carassius auratus*: Yoshiura et al, 1997; sériole, *Seriola dumerili*: Garcia Hernandez et al, 1997). Néanmoins, cette idée de dualité des gonadotropines n'a pas été de suite généralisée à l'ensemble des téléostéens. En effet, les nombreuses tentatives de purification de la FSH chez des espèces de téléostéens d'origine plus ancienne, comme le poisson-chat (siluridés) ou l'anguille, sont longtemps restées infructueuses, ce qui a amené certains auteurs à mettre en doute son existence chez les espèces d'origine ancienne (Schultz et al, 1995).

Le clonage, par Yoshiura et ses collaborateurs (1999), de la sous-unité FSH β chez l'anguille japonaise, appartenant au groupe des Elopomorphes, a permis de clarifier cette question de la dualité des gonadotropines chez les téléostéens. La séquence de la sous-unité FSH β a également été obtenue chez l'anguille européenne dont nous avons réalisé le clonage (article 1 de cette thèse) et chez d'autres téléostéens appartenant au groupe des siluridés (*Ictalurus punctatus*: Liu et al, 2001; *Clarias gariepinus*: Vischer et al, 2003).

Ces données permettent de conclure que la présence de deux hormones gonadotropes, LH et FSH, est un caractère commun et conservé au sein des téléostéens; en effet, il est observé à la fois chez des téléostéens d'origine récente et d'origine plus ancienne. Une étude comparative des séquences nucléotidiques des sous-unités GP α , LH β et FSH β chez différents téléostéens montre qu'il existe une évolution rapide de la sous-unité FSH β en comparaison de la sous-unité LH β qui, elle, montre une plus grande conservation au cours de l'évolution (Quérat et al, 2000), ce qui permet de comprendre pourquoi la caractérisation de la FSH a été si compliquée.

Les sous-unités FSH β et LH β ont aussi été clonées chez l'esturgeon, *Acipenser baeri* (Quérat et al, 2000), représentant du groupe des chondrostéens, ce qui indique que

l'apparition des deux hormones gonadotropes est un caractère ancien et commun aux chondrostéens et aux néoptérygiens représentés ici par les téléostéens.

Chez les tétrapodes, en plus des mammifères, la dualité des hormones gonadotropes a été démontrée chez d'autres groupes : oiseaux, avec par exemple la purification des deux hormones chez le poulet (Stockell-Hartree et Cunningham, 1969) ou l'autruche (Koide et al, 1996), le clonage des sous-unités des gonadotropines chez la caille (Ando et Ishii, 1994 ; Kikuchi et al, 1998) ; « reptiles et amphibiens » avec la purification des deux hormones chez différents représentants (batraciens, crocodiliens, chéloniens ; pour revue : Licht, 1979).

Le récent clonage des trois sous-unités des gonadotropines chez le dipneuste, *Neoceratodus forsteri* (Quérat et al, 2004) permet de conclure que la dualité des gonadotropines, observée chez différents représentants des tétrapodes et chez le dipneuste, est un caractère commun aux sarcoptérygiens.

L'ensemble des résultats décrits précédemment montre que la présence des deux hormones gonadotropes est un trait commun aux sarcoptérygiens (ayant pour caractère propre des membres monobasaux) (dipneuste, tétrapodes) et aux actinoptérygiens (ayant pour caractère propre des nageoires rayonnées) (téléostéens, chondrostéens), ce qui a permis de faire remonter l'origine de la dualité des gonadotropines au moins à un de leurs ancêtres communs appartenant aux ostéichthyens.

Enfin, la mise en évidence par Quérat et ses collaborateurs (2001) des trois sous-unités $GP\alpha$, $LH\beta$ et $FSH\beta$ des gonadotropines par clonage chez la roussette, *Scyliorhinus canicula* représentant du groupe des chondrichthyens a permis de faire remonter l'apparition des deux lignées moléculaires LH et FSH aux gnathostomes.

En revanche, les travaux réalisés chez la lamproie (*Petromyzon marinus*) n'ont, à ce jour, permis de mettre en évidence qu'une seule gonadotropine (pour revue : Kawauchi et Sower, 2006), ce qui permet d'appuyer l'hypothèse d'une apparition des deux lignées moléculaires gonadotropes chez les gnathostomes.

Durant cette thèse, nous avons étudié l'expression et la régulation des deux gonadotropines LH et FSH chez l'anguille européenne. La séquence de l'ADN complémentaire de la sous-unité $LH\beta$ de l'anguille européenne ayant déjà été obtenue (Quérat

et al, 1990) et un dosage radioimmunologique ayant été mis au point (Dufour et al, 1983a), un certain nombre de données concernant la régulation de l'expression, la synthèse et la sécrétion de l'hormone LH étaient déjà disponibles (Dufour et al, 1983b ; Counis et al, 1987 ; Dufour et al, 1989 ; Quérat et al, 1991 ; Huang et al, 1997).

En revanche, les outils moléculaires permettant l'étude de l'hormone FSH faisaient défaut ; nous avons donc travaillé à l'obtention de la séquence de l'ADN complémentaire de la sous-unité β de la FSH (article 1). À partir des séquences des différentes sous-unités des gonadotropines ($GP\alpha$, $LH\beta$ et $FSH\beta$), nous avons pu mettre en place les outils moléculaires permettant l'étude de leur expression hypophysaire.

1.2. Sites d'expression hypophysaires des hormones gonadotropes.

Nous nous sommes intéressés au(x) site(s) d'expression des sous-unités β des gonadotropines. En effet, ce sont elles qui vont donner aux hormones glycoprotéiques leur spécificité d'action et donc elles qui vont être sujet à une régulation fine au cours du cycle.

La synthèse de sondes spécifiques pour les sous-unités $LH\beta$ et $FSH\beta$ nous a permis de localiser, par hybridation *in situ* sur des coupes adjacentes d'hypophyse, les sites d'expression des gènes (Article 1). Nous avons observé que les deux sous-unités sont exprimées dans la *pars distalis* proximale de l'adenohypophyse mais dans des zones différentes suggérant fortement l'existence de deux types de cellules gonadotropes : les cellules à FSH et les cellules à LH. Néanmoins, cette hypothèse nécessite confirmation en utilisant par exemple des techniques de double marquage sur une même coupe, ou encore après microdissection et isolation de cellules gonadotropes, par dosage de l'expression dans une seule cellule (technique de « single cell PCR »).

Ce mode d'expression des gonadotropines dans deux cellules différentes a également été retrouvé chez d'autres téléostéens (salmonidés : *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* : Nozaki et al, 1990a, 1990b ; *Oncorhynchus keta* : Naito et al, 1993 ; thon, *Thunnus thunnus* : Kagawa et al, 1998 ; tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* : Melamed et al, 1998 ; Yaron et al, 2003 ; athérine d'Argentine, *Odontesthes bonariensis* : Miranda et al, 2001 ; daurade, *Sparus aurata* : Garcia-Ayala et al, 2003 ; *Fundulus heteroclitus* : Shimizu et al, 2003 ; flétan, *Hippoglossus hippoglossus* : Weltzien et al, 2004).

L'ensemble de ces travaux conduit à penser que l'expression des deux gonadotropines dans des cellules différentes est un caractère partagé par les téléostéens. Néanmoins, une récente étude réalisée chez la sériole (*Seriola dumerili*) à l'aide d'antisérums homologues indique la présence de cellules bihormonales, c'est-à-dire capable à la fois de produire la LH et la FSH, et de cellules monohormonales (Garcia Hernandez et al, 2002). La présence de deux types cellulaires gonadotropes (sécrétant soit la LH soit la FSH) semble donc être le cas majoritaire rencontré chez les téléostéens, mais d'autres cas peuvent aussi exister.

Une récente étude réalisée chez le polyptère (*Polypterus endlicheri*), poisson appartenant à un groupe d'origine ancienne parmi les actinoptérygiens (les cladistiens), montre l'existence de deux types de cellules morphologiquement différentes dans l'hypophyse marquées par des anticorps anti-LH, anti-FSH et anti-TSH hétérologues (Miki et al, 2005). Malheureusement, les auteurs n'ont pas réussi à distinguer les sites d'expression des différentes hormones.

Chez les tétrapodes, la situation varie en fonction des groupes et des espèces :

- Chez les mammifères, il est classiquement admis que les cellules gonadotropes sont capables de synthétiser à la fois la LH et la FSH, même si des travaux réalisés chez différentes espèces ont permis de mettre en évidence l'existence à la fois de cellules monohormonales (synthétisant soit la LH, soit la FSH) et de cellules bihormonales (ayant la capacité de synthétiser les deux hormones). Des travaux chez le rat ont, de plus, montré que la proportion des différents types de cellules pouvait varier au cours du cycle, le nombre de cellules gonadotropes bihormonales passant de 45% au moment du diestrus, à plus de 70% au moment de l'oestrus (Childs et al, 1994). D'autres travaux réalisés chez l'homme (Pelletier et al, 1976) ou chez le porc (Dacheux, 1978) indiquent que chez ces espèces, la majorité des cellules gonadotropes sont bihormonales. Chez le cheval, une étude récente montre également que la majorité des cellules gonadotropes est bihormonale (Eagles et al, 2000).
- Chez les oiseaux, à notre connaissance, peu de données sont disponibles concernant les cellules gonadotropes. Néanmoins, une récente étude réalisée chez

le poulet (Proudman et al, 1999) par immunodétection montre que les hormones gonadotropes sont synthétisées par des cellules différentes.

- Chez les amphibiens, des travaux réalisés chez différentes espèces de grenouilles (*Rana catesbeiana*: Tanaka et al, 1990 ; *Rana esculenta* : Pinelli et al, 1996) par immunocytochimie ont amené les différents auteurs à supposer une expression double des cellules gonadotropes, celles-ci seraient donc capable d'exprimer à la fois la LH et la FSH.

Ainsi, chez les tétrapodes, différents cas sont rencontrés selon les groupes: un seul type cellulaire bihormonal (amphibiens et mammifères) ou deux types cellulaires monohormonaux (oiseaux).

Des études complémentaires chez les espèces dont les ADNc des sous-unités des gonadotropines sont disponibles (Quérat et al, 2001) et qui appartiennent à des groupes phylogénétiquement anciens chez les actinoptérygiens (esturgeon), les sarcoptérygiens (dipneuste) et les chondrichthyens (roussette), permettraient d'apporter des éléments essentiels pour conclure quant à l'origine de la dualité des cellules gonadotropes.

L'existence d'une cellule unique ou de deux cellules gonadotropes selon les groupes, les espèces ou la situation physiologique suggère des différences dans les mécanismes de régulation des gonadotropines et montre l'intérêt de leur étude comparée chez différents représentants des vertébrés. En effet, les gonadotropines sont régulées de façon différentielle en relation avec les rôles distincts qu'elles ont au cours du développement gonadique. Lorsqu'elles sont exprimées par des cellules différentes, les régulations de production des gonadotropines vont pouvoir s'exercer indépendamment au niveau des deux cellules. Lorsque les deux gonadotropines sont exprimées par une même cellule, les régulations deviennent alors plus complexes, nécessitant la mise en place de voies de signalisation différentes lorsqu'un même facteur est capable de réguler de façon différentielle à la fois la LH et la FSH.

1.3. Mesure des taux d'expression des hormones gonadotropes.

Le clonage des trois sous-unités des gonadotropines $GP\alpha$, $LH\beta$ et $FSH\beta$ nous a permis de suivre leurs expressions, au cours d'étapes clés de la vie de l'animal ou encore suite à des traitements hormonaux. Nos premiers travaux ont mis en œuvre des techniques de dot blot pour l'étude des messagers des trois sous-unités des gonadotropines. Ces travaux ont été réalisés au cours de deux stades critiques du cycle de vie de l'anguille : 1) le processus d'argenture (article 2 et discussion § 2) qui est une étape accessible dans des conditions naturelles mais qui reste méconnue du point de vue du contrôle hormonal ; et 2) la maturation sexuelle (article 1 et discussion § 3) qui est un stade non accessible dans des conditions naturelles et n'est abordable aujourd'hui que par l'expérimentation.

Puis, dans le but d'augmenter la précision de nos résultats et d'améliorer les seuils de détection des messagers codant pour $GP\alpha$, $LH\beta$ et $FSH\beta$, nous avons développé des techniques de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) et les avons appliquées à l'étude des effets des hormones stéroïdes (articles 1 et 3, discussion § 3), des peptides gonadiques (article 4, discussion § 4) et d'hormones métaboliques (études complémentaires et discussion § 5). Ces techniques de dosage par qRT-PCR ont l'avantage d'une grande sensibilité permettant de détecter de très faible quantité d'ARNm, ce qui nous a permis de travailler sur des hypophyses individuelles à des stades où les hormones gonadotropes sont encore peu exprimées. Nous avons également pu miniaturiser le système de culture cellulaire jusqu'à 50 000 cellules par puits (correspondant à environ 1/4 de l'hypophyse d'une anguille de 200g) (article 3) alors qu'auparavant l'approche par dot blot nécessitait 200 000 à 500 000 cellules par puits (Huang et al, 1997).

Ces techniques centrées sur l'expression des ARNm nous ont permis de mettre en évidence un certain nombre de facteurs entrant en jeu dans la régulation de l'expression des gonadotropines. Néanmoins, des études complémentaires s'intéressant aux protéines à l'aide de techniques immunologiques telles que les dosages RIA ou ELISA sont nécessaires pour compléter les informations et s'assurer que les variations d'expression des messagers observées sont bien le reflet d'une variation de production des protéines.

Chez l'anguille européenne, l'hormone lutéinisante a pu être étudiée grâce à la mise au point d'un dosage radioimmunologique à l'aide d'anticorps anti- $LH\beta$ de carpe reconnaissant

également la LH β d'anguille (Dufour et al, 1983a). Nos résultats obtenus au cours de l'argenture et de la maturation expérimentale (articles 1 et 2) montrent des variations parallèles des messagers et des contenus hypophysaires en hormone. Ce parallélisme a été également observé lors des expériences *in vitro* où les cellules sont soumises à des traitements stéroïdiens (Huang et al, 1997, 1999). Ces observations nous permettent de supposer que les régulations trouvées (discussion § 3) au niveau des messagers sont directement répercutées sur la synthèse de la protéine et sont donc le reflet de la production de l'hormone. En revanche, les données obtenues par les dosages plasmatiques de LH (Huang et al, 1997, 1999) montrent qu'il existe une dissociation entre les contrôles de la production (synthèse des messagers et de l'hormone) et les contrôles de la sécrétion de LH. Par exemple, des études précédentes ont montré chez des anguilles traitées à l'oestradiol, une stimulation de la production de LH qui s'accumule dans les cellules de l'hypophyse sans modifications des taux plasmatiques en LH (Dufour et al, 1983b ; Dufour et al, 1988). Cette dissociation dans les mécanismes de contrôles de la production et de la sécrétion de LH peut, par exemple, permettre l'accumulation au niveau hypophysaire de la LH en prévision du pic ovulatoire.

Concernant l'hormone folliculo-stimulante, des travaux, en collaboration avec l'INRA (Nouzilly et Rennes), sont actuellement réalisés dans le but de produire de la FSH recombinante d'anguille et de développer des anticorps anti-FSH permettant d'étudier la production de l'hormone et sa libération.

Des études chez deux salmonidés, où les expressions des messagers et des protéines ont été suivies de manière parallèle, montrent des différences dans les contrôles de la production et de la sécrétion des gonadotropines. Chez le saumon coho, les variations induites sur les ARNm et les contenus hypophysaires en LH et FSH par des traitements stéroïdiens sont similaires ; en revanche, elles diffèrent des variations observées pour les taux plasmatiques en LH et FSH (Dickey et Swanson, 1998). Chez la truite arc-en-ciel, les deux hormones ainsi que leurs messagers ont été suivis au cours du cycle (Gomez et al, 1999). Dans ce cas, les auteurs observent un relatif parallélisme entre les ARNm, les contenus hypophysaires et les taux plasmatiques en FSH ; en revanche, pour la LH, les taux plasmatiques évoluent séparément par rapport aux ARNm et aux contenus hypophysaires. A partir de ces travaux, mettant en évidence des systèmes de contrôle différents pour la production et la sécrétion des gonadotropines, on remarque également la variabilité des systèmes de régulation mis en place chez les différentes espèces.

2. Activation de l'axe gonadotrope et expression différentielle des hormones gonadotropes au cours de l'argenture : arguments en faveur d'un évènement pubertaire plutôt que métamorphique (article de revue 5)

2.1. Résumé de l'article

Dans le cycle biologique de l'anguille, l'argenture (transformation d'anguille jaune en anguille argentée) a toujours été considérée comme une seconde métamorphose, par rapport à la métamorphose larvaire (transformation de la larve leptocéphale en civelle). En effet, comme les « vraies » métamorphoses, l'argenture consiste en de nombreux changements morphologiques, physiologiques et comportementaux incluant des modifications structurelles et fonctionnelles de différents organes (peau, œil, branchie, vessie natatoire et intestin), l'induction d'un comportement migratoire ou encore l'arrêt d'alimentation. Ces changements sont nécessaires à la migration de reproduction et préadaptent l'anguille à sa future vie océanique en profondeur. Néanmoins, certains des changements observés lors de l'argenture sont directement en relation avec la fonction de reproduction, comme l'augmentation significative du poids des gonades et des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels, suggérant que l'argenture pourrait aussi être considérée comme un évènement pubertaire.

Chez les vertébrés, la métamorphose est principalement induite par l'axe neuroendocrine thyroïdienne, en effet, de fortes augmentations de la thyroïdine (TSH) hypophysaire et des niveaux circulants des hormones thyroïdiennes (thyroxine, T4 et triiodothyronine, T3) sont observées chez les amphibiens lors du climax métamorphique. La puberté, elle, est induite par l'axe gonadotrope, avec des augmentations des gonadotropines hypophysaires (hormone lutéinisante, LH et hormone folliculo-stimulante, FSH) et des stéroïdes sexuels. Afin de déterminer l'axe neuroendocrine impliqué dans l'induction de l'argenture, nous avons analysé les profils de différentes hormones hypophysaires et périphériques pendant la transition anguille jaune - anguille argentée (Article 2). Une comparaison avec la smoltification, qui est une « vraie » « métamorphose secondaire » observée chez les salmonidés, est également donnée.

Pas ou peu de variations des hormones thyroïdiennes plasmatiques et des niveaux hypophysaires d'ARNm de la TSH β sont observées au cours de l'argenture. De même, l'axe somatotrope, qui contrôle la croissance et le développement chez les vertébrés, ne semble pas activé, puisque aucune augmentation des niveaux hypophysaires d'ARNm et de protéine pour

la GH, ni des concentrations plasmatiques en GH, n'est observée. En revanche, une forte activation de l'axe gonadotrope est montrée pendant la transition anguille jaune - anguille argentée. Une augmentation significative des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels (estradiol, testostérone et 11 keto-testostérone) et en vitellogénine a lieu. De plus, l'expression hypophysaire des deux gonadotropines est augmentée : les ARNm codant pour la FSH β augmentent dès les premières étapes du processus de l'argenture, alors que les ARNm codant pour la LH β , ainsi que le contenu hypophysaire en LH, augmentent fortement, plus tard au cours de l'argenture.

Des données expérimentales, utilisant des stéroïdes sexuels exogènes, sont en accord avec l'implication de l'axe gonadotrope dans l'induction de l'argenture. En effet, des injections d'androgènes sont capables d'induire les changements morphologiques observés pendant l'argenture, comme l'augmentation du diamètre de l'œil et de l'épaisseur de la peau et la régression du tractus digestif. Ceci suggère que les stéroïdes sexuels pourraient être responsables des changements morpho-physiologiques de l'argenture chez l'anguille, comme le sont les hormones thyroïdiennes dans le cas d'une « vraie » métamorphose. Ceci est supporté par des données antérieures de maturation expérimentale, qui montrent une amplification des changements morphologiques de l'argenture, probablement due à l'augmentation des stéroïdes sexuels endogènes.

Toutes ces données permettent de conclure que l'argenture de l'anguille s'apparente davantage à un début de puberté qu'à une « vraie » métamorphose.

2.2. Texte de l'article de revue 5 : « Silvering: metamorphosis or puberty? Rousseau K, Aroua S et al (sous presse) in 'Migration and Reproduction of the European eel' (G. van den Thillart, S. Dufour, C. Rankin, eds), Springer Publisher.

Chapter 3

Silvering: metamorphosis or puberty?

Karine Rousseau¹, Salima Aroua¹, Monika Schmitz², Pierre Elie³ and Sylvie Dufour¹.

¹*Museum National d'Histoire Naturelle, DMPA, UMR CNRS 5178 "Biology of Marine Organisms and Ecosystems", 7 rue Cuvier, CP 32, 75231 Paris cedex 05, France.*

²*Department of Biology, Karlstad University, S-651 88 Karlstad, Sweden.*

³*Unité Ressources Aquatiques Continentales, Cemagref-Bordeaux, 33612 Cestas Cedex, France.*

Tel: +33-140793612

Fax: +33-140793618

dufour@mnhn.fr

Contents

- 1 Introduction
- 2 Definitions and neuroendocrine control of metamorphosis and puberty in vertebrates
 - 2.1 Metamorphosis
 - 2.1.1 Larval metamorphosis
 - 2.1.2 Secondary metamorphosis (smoltification)
 - 2.2 Puberty
- 3 "Metamorphic" and "pubertal" physiological changes during eel silvering
 - 3.1 Skin and eyes
 - 3.2 Gonads
 - 3.3 Metabolism and digestive tract
- 4 Neuroendocrine axes involved in the control of silvering
 - 4.1 Thyrotropic axis
 - 4.2 Somatotropic axis
 - 4.3 Corticotropic axis
 - 4.4 Gonadotropic axis
 - 4.5 Experimental induction of silvering changes
- 5 Conclusions
- References

1 INTRODUCTION

Eels have a complex migratory life cycle with the occurrence of two metamorphoses (for reviews: Sinha and Jones 1975; Tesch 1977; Haro 2003). They present a typical larval (first) metamorphosis, the leptocephalus larva being transformed into the glass eel. After this drastic transformation, the growth phase starts in the continental waters and glass eels become “yellow” eels. After many years in freshwater, the yellow eels transform into “silver eels which stop growing and start their downstream migration towards the ocean and the area of reproduction. To allow this transition from sedentary life in freshwater to migrant life in seawater, eels undergo their second metamorphosis, known as silvering. Silvering not only preadapts the eel to deep-sea conditions (Sébert 2003), but also prepares for sexual maturation, which will only be completed during the oceanic migration towards the Sargasso Sea (Tesch 1982, 1989; Dufour and Fontaine 1985; Fontaine 1985; Dufour 1994). At the silver stage, eels are blocked at a prepubertal stage (Dufour et al. 2003) but chronic administration of carp or salmon pituitary extract (gonadotropic treatment) is able to induce sexual maturation (Fontaine et al. 1964; Fontaine 1975). The lack of sexual maturation at the silver stage is due to a deficient production of pituitary gonadotropins (GtHs) (Dufour et al. 1983). Stimulation of synthesis and release of pituitary gonadotropin in the silver eel could be induced by combined treatment with a GnRH-agonist and a dopamine-antagonist, indicating that a double neuroendocrine blockade was responsible for the deficient pituitary gonadotropic function: a lack of endogenous stimulation by GnRH due to a deficient production of GnRH and a strong dopaminergic inhibition of GnRH action (Dufour et al. 1988, 1991; Vidal et al. 2004). At the yellow stage, in contrast, gonadotropic treatment has no significant effect on both gonad weight (Leloup-Hatey et al. 1989) and body color (Lopez and Fontaine 1990).

Eel silvering has always been considered as a metamorphosis. This is probably due to the great similarities which exist between the morphological changes observed during silvering and the ones occurring during smoltification in salmonids. However, unlike smoltification, silvering also includes some changes related to an onset of sexual maturation such as gonad development. These observations led to the hypothesis that silvering could correspond to a pubertal event. Indeed, puberty encompasses various morpho-physiological and behavioral changes, which, unlike metamorphic changes, are induced by sexual steroids (for review, see Romeo 2003). While metamorphosis is mostly triggered in vertebrates by the activation of the thyrotropic neuroendocrine axis, puberty is triggered by the activation of the gonadotropic axis. Our work aimed at investigating whether eel silvering should be considered as a « true » metamorphosis or as an onset of puberty, by comparing the profiles of pituitary and peripheral hormones during the transition from yellow to silver eels. This chapter reviews the morphological changes and describes the hormonal patterns occurring during eel silvering.

2. Definitions and neuroendocrine control of metamorphosis and puberty in vertebrates

Metamorphosis and puberty are two major events of the postembryonic development in vertebrates. While they present common features regarding morphological and behavioural modifications, they are controlled by different neuroendocrine axes.

2.1 Metamorphosis

Metamorphosis allows the transition from one developmental stage in a specific environment (ecophase 1) to the next stage in a different environment (ecophase 2), and includes a migration between the two habitats. Metamorphosis corresponds to drastic

changes in body shape, physiology and behaviour, and, unlike puberty, is encountered only in a few phyla/species.

In vertebrates, the most described metamorphosis is the transformation in amphibians of the aquatic larva (tadpole) into the terrestrial juvenile. Larval metamorphosis is also encountered in some other vertebrates, such as lampreys and some teleosts (elopomorphes and pleuronectiformes). In teleosts, different types of metamorphoses can be observed (Figure 1). Youson (1988) proposed three pathways of ontogeny between the embryo and the adult: -direct development from the embryo period leading to the juvenile and adult period (many examples such as goldfish); -a typical indirect development involving a larval metamorphosis (first or “true” metamorphosis) leading to the juvenile period (example: flatfishes and eels); and a non-classical metamorphosis occurring during the juvenile period (example: the secondary metamorphosis, smoltification, in salmon). Compared to larval metamorphosis, less drastic morphological, physiological and behavioural changes occur in juveniles of some migratory teleosts and are referred to as “secondary metamorphoses”. This is the case in smoltification of salmon and silvering of eels.

2.1.1. Larval metamorphosis

Gudernatsch, in 1912, demonstrated for the first time the stimulatory role of the thyroid gland in the control of metamorphosis in amphibians. Indeed, when feeding tadpoles with thyroid gland extracts, he observed that their transformation to frogs was accelerated. Conversely, Allen (1916) was able to completely prevent metamorphosis by thyroidectomy. Since these experiments, the positive role of thyrotropic axis in the control of larval metamorphosis has been further studied in amphibians. The pair of thyroid glands is first detectable after embryogenesis when the tadpole begins to feed. Under the control of pituitary thyrotropin (TSH), these glands produce thyroid hormones (THs: thyroxine, T₄ and triiodothyronine, T₃), which act on target organs via specific receptors. It was shown that as the thyrotropic axis was activated, a series of sequential morphological transformations occurred. An early change is the growth and differential of the limbs which in the absence of hormone still form, but will not progress beyond the bud stage. The final morphological change, tail resorption, occurs when the level of THs is highest at the climax of metamorphosis (for reviews: Kanamori and Brown 1996; Tata 2006).

Thyrotropin (TSH), a pituitary glycoprotein hormone, belonging to the same family as gonadotropins, controls the production of THs in Amphibians (Manzon and Denver, 2004), as classically shown in mammals (for review: McNabb, 1992). Early studies of hypophysectomy and immunization demonstrated that TSH played a central role in amphibian metamorphosis (Dodd and Dodd, 1976; Eddy and Lipner, 1976). Indeed, Dodd and Dodd (1976) showed that the negative effect of hypophysectomy prior to metamorphosis could be reversed by treatment with mammalian TSH. Furthermore, passive immunization of tadpoles with an antiserum to bovine TSH prevented spontaneous metamorphosis (Eddy and Lipner, 1976). Morphological and biochemical changes observed during metamorphosis, such as complete regression of tail and gills, *de novo* formation of bone, visual pigment transformation or functional differentiation of liver, can be induced by THs (for review: Tata, 1998; Shi, 1999). In contrast to the situation in mammals, in which the brain peptide discovered for its stimulatory control on TSH is TRH (for Thyrotropin Releasing Hormone) (Morley, 1981), the brain neurohormone responsible for the activation of TSH production during amphibian metamorphosis is corticotropin-releasing hormone (CRH) and not TRH (for review: Denver, 1999). In fact, in amphibians, the production and release of TSH by the pituitary appears to be regulated by different neuropeptides according to the life stage. Indeed, in premetamorphic amphibians, stimulation of the pituitary-thyroid axis is only responsive to CRH-like peptides and unresponsive to all other neurohormones tested, including TRH (Denver and Licht, 1989; Denver, 1993). Thus, CRH is the thyrotropin-releasing factor during the induction of metamorphosis in tadpoles, and the stimulatory action of TRH on

TSH secretion develops after metamorphic climax (for review: Denver, 1999; Tata, 2006).

Although THs are the only obligatory signal for the initiation and completion of amphibian metamorphosis, other hormones can modulate the onset and progression of metamorphosis (Tata 2006). These include glucocorticoids and prolactin (PRL), which can accelerate and prevents TH-induced metamorphosis, respectively (for reviews: White and Nicoll 1981; Kikuyama et al. 1993).

In fish, the involvement of the thyroid axis in larval metamorphosis (primary metamorphosis) was reported by Murr and Sklower (1928) who showed an increase in thyroid gland development of European eel *leptocephalus* larvae; this observation was further confirmed in another Anguilliform species, *Conger myriaster* (Kubota 1961; Yamano et al. 1991). This activation of the thyroid gland was also observed during larval flounder metamorphosis (*Paralichthys olivaceus*: Miwa and Inui 1987b). In addition, measurement of thyroid hormone body content indicated a significant increase of T3 and T4 in early stage of larval metamorphosis in flounder (Miwa et al. 1988; Tagawa et al. 1990) as well as in conger eel (Yamano et al. 1991). TH treatment induces flounder metamorphosis at both the whole body level (Inui and Miwa 1985; Miwa et al. 1988), and at the tissue level: erythrocytes (Miwa and Inui 1991), skeletal muscle (Yamano et al. 1991), gastric glands (Miwa et al. 1992; Huang et al. 1998; Soffientino and Specker 2001), chloride cells in the gill (Schreiber and Specker 2000) and bone remodelling for eye relocation (Solbakken et al. 1999; Okada et al. 2003). Experiments with TH deficiency led to the inhibition of pigmentation on the left side of the body and the inhibition of bone remodelling and right eye relocation (Inui and Miwa 1985; Miwa and Inui 1987a; Schreiber and Specker 1998; Okada et al. 2003). TH deficiency also inhibits the development of the anal fin pterygiophore and the body height reduction, the absorption of the dorsal fin ray, the formation of actinost and distal radials of the pectoral fin, and the pectoral fin shrinkage (Inui and Miwa 1985; Miwa and Inui 1987a; Okada et al. 2003). Both T4 and T3 directly stimulated, *in vitro*, the shortening of the cultured flounder fin rays isolated from prometamorphic larvae, and cortisol synergized with thyroid hormones (de Jesus et al. 1990). In contrary, both estradiol and testosterone attenuate the response of the fin rays to T3 *in vitro* (de Jesus et al. 1992). Similarly, when prometamorphic flounder larvae are immersed in solutions containing steroids, fin ray shortening is delayed, as well as eye migration and the development of benthic preference (de Jesus et al. 1992). Prolactin also antagonizes TH action *in vitro* and *in vivo* on fin ray shortening (de Jesus et al. 1993). Exogenous thyroid hormone has also been shown to stimulate metamorphoses in leptocephali of *Conger myriaster* (Kitajima et al. 1967) and of *Anguilla anguilla* (Vilter 1946), confirming the major role of THs in the induction of elopomorph larval metamorphosis. The role of THs would be crucial up to the final steps of glass eel metamorphosis. A central role for THs in the regulation of mechanisms leading to the colonization of continental habitats by *Anguilla anguilla* glass eels was first hypothesized by Fontaine and Callamand (1941) and demonstrated later by Edeline et al (2004, 2005). Indeed, in European glass eels, river-colonizers exhibit an increased thyroid status compared to estuarine migrants (Edeline et al. 2004) and locomotor activity of glass eels was significantly increased by treatment with T4, while decreased by thiourea (Edeline et al. 2005). A correlation between decreasing T4 levels and the transition from pelagic toward benthic behaviour was shown in glass eels *A. anguilla* held in an aquarium (Jegstrup and Rosenkilde 2003). These data demonstrate the involvement of thyroid hormones as a major determinant of metamorphosis induction in eels, as in flatfish. Further studies are clearly needed to investigate the potential synergistic or antagonistic roles of other hormones as well as to determine the brain-pituitary control of thyroid function in teleosts.

2.1.2 Secondary metamorphosis (smoltification)

A hyperactivity of the thyroid gland was also demonstrated by histological studies during the parr-smolt transition (secondary metamorphosis) of Atlantic salmon *Salmo salar* (Hoar 1939). The involvement of the thyroid axis in the control of smoltification was later confirmed by Fontaine and Leloup (1960) by physico-chemical studies and more recently reviewed by Boeuf (1993). The administration of exogenous TH to juvenile parr-status salmonids results in morphological and physiological changes consistent with the parr-smolt transformation (for reviews: Boeuf 1993). For example, treatments with THs or with TSH have been able to induce the characteristic color change (silvering) of the skin, via an effect on purine and pteridine deposition (Chua and Eales 1971; Premdas and Eales 1976; Miwa and Inui 1985; Coughlin et al. 2001). THs are also able to induce the metabolic and muscular changes necessary for the oceanic migration. For instance, treatment of coho salmon with T3 in the diet accelerated the increase in concentration of adult forms of blood haemoglobin, while dietary PTU reduced this increase during smoltification (for review: Hoar 1988). Thyroid hormones induce a shift towards slower isoforms of the muscle protein myosin heavy chain (Coughlin et al. 2001), and increase muscle contraction and maximum force (Katzman and Cech 2001). Moreover, when anti-thyroid drugs such as PTU have been administered to smoltifying coho salmon, there was impairment to the body colour and retinal pigmentary changes (Sullivan et al. 1987; Alexander et al. 1998). Concerning olfaction, an early study showed that artificially increased TH levels induced parr to imprint to artificial odors, while parr with unaltered hormone levels did not (Scholz 1980). More recently, using intraperitoneal implants of T3 for 16-20 days to mimic smolting, Lema and Nevitt (2004) demonstrated that T3 could induce olfactory cellular proliferation in juvenile coho salmon. Finally, the involvement of THs in stimulation of migratory behaviour (loss of positive rheotaxis and territoriality, and start of schooling) has been well documented (Baggerman 1963; Godin et al. 1974; Fontaine 1975; Youngson et al. 1985; Iwata et al. 1989; Boeuf and Le Bail 1990).

In conclusion, thyroid hormones are clearly involved in smoltification. However, they are probably not sufficient to induce all the smoltification-related changes. Other hormones such as GH and cortisol may be required for their synergizing action with THs in the control of osmoregulation and metabolism during the parr-smolt transformation. For example, administration of GH clearly improves hypo-osmoregulatory ability and seawater survival of parr (for review: Donaldson et al. 1979; Boeuf 1993), and induces other smoltification-related changes, such as condition factor and skin pigmentation (for review: Donaldson et al. 1979).

A study in adult salmon suggests a role for CRH and/or TRH in the control of TSH, with variations possibly depending on species or physiological status (Larsen et al., 1998). Further studies are clearly needed to investigate which brain neuromediator is specifically implicated in the triggering of smoltification.

2.2 Puberty

The term of puberty, first defined in humans, has been subsequently extended to the first acquisition of the capacity to reproduce in all mammalian and non-mammalian vertebrates as well as in invertebrates. By definition, puberty occurs in all species but only once in the life cycle.

In all vertebrates, puberty is triggered by the activation of the gonadotropic axis, constituted of a brain neuropeptide (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), pituitary glycoprotein hormones (gonadotropins: luteinizing hormone, LH and follicle stimulating hormone, FSH) and gonadal steroids. Sex steroids induce the morpho-physiological and behavioural transformations characteristic of puberty.

The scheme (GnRH/LH-FSH/sex steroids) is largely conserved among vertebrates (Okuzawa 2002), even though additional controls may occur such as the dopaminergic inhibition of gonadotropin production in some teleosts (for reviews: Dufour et al. 2005;

Pasqualini et al. 2004). Indeed, pioneer works from Peter and collaborators on goldfish, using hypothalamic lesions, demonstrated the existence of a GRIF (gonadotropin release-inhibiting factor) (Peter and Crim 1978; Peter et al. 1978; Peter and Paulencu 1980). Subsequent studies using agonists or antagonists *in vivo* (Chang and Peter 1983; Chang et al. 1984), primary culture of pituitary cells *in vitro* (Chang et al. 1990) and immunocytochemistry (Kah et al. 1984, 1986, 1987) provided evidence that GRIF was dopamine (DA). An inhibitory role of DA on the control of LH has been demonstrated in many adult teleosts at the time of ovulation and spermiation (catfish: De Leeuw et al. 1986; Van Asselt et al. 1988; coho salmon: Van der Kraak et al. 1986; rainbow trout: Linard et al. 1995; Saligaut et al. 1999; common carp: Lin et al. 1998; tilapia: Yaron et al. 2003). However, DA does not play an inhibitory role in all adult teleosts (Atlantic croaker: Copeland and Thomas 1989; gilthead seabream: Zohar et al. 1995). Concerning the early stages of gametogenesis and the control of puberty, the possible involvement of DA has only been studied, up to now, in bass, eel and mullet. In juvenile striped bass (Holland et al. 1998) and red seabream (Kumakura et al. 2003), data refuted a role for DA in the prepubertal control of gonadotropins, as GnRH alone was able to trigger precocious puberty. In contrast in European eel only a triple treatment with testosterone, GnRH agonist and pimozide (DA D2-type receptor antagonist) could induce increases in LH synthesis and release, indicating that removal of DA inhibition is required in the prepubertal eel for triggering GnRH-stimulated LH synthesis and release (Dufour et al. 1988; Vidal et al. 2004). A recent study in the grey mullet has demonstrated that D2 type receptor expressions in the brain and in the pituitary were high at the early and intermediate stages of puberty (Nocillado et al. 2007), when inhibition of the reproductive function by DA is particularly pronounced (Aizen et al. 2005).

3. “Metamorphic” and “pubertal” physiological changes during eel silvering

During the silvering process, in addition to important behavioural changes such as transition from a sedentary to a migrating behavior and the start of starvation, drastic morphological changes are observed. An extensive description of silvering morphometric changes is given in Chapter 2. Downstream migration is a common behavioural feature of silvering and smoltification and is discussed in other Chapters of this book. The capacity to adapt to seawater is also observed during these two “metamorphoses”, but is less drastic during silvering compared to smoltification, as yellow eels are already able to survive in salt water (Chapter 6). Modifications of swimbladder, which enable fish to live in deep water are reported and described in Chapter 5. Here, we briefly describe modifications, which concern organs (skin, eyes, gonads, metabolism and digestive tract) on which hormonal control has been studied.

3.1 Skin and eyes

During the sedentary growth phase, the back of the eel is greenish-brown and the ventral surface is yellow, while at the time of the oceanic migration of reproduction, they are respectively blackish-brown and silvery-white. The silvering of the skin is thought to be the result of an increase of dorsal melanin and/or ventral purines (Bertin 1951; Pankhurst and Lythgoe 1982). This phenomenon is also observed in other migratory teleosts such as salmonids, where an increase in purine deposition in skin was observed during the parr-smolt transformation (Staley and Ewing 1992) and would correspond to an adaptation to the oceanic pelagic migration, limiting the visibility of the fish for their predators. In addition to this change in colour, the skin becomes thicker (Bertin 1951; Pankhurst 1982a).

The eye is probably one of the most modified sensory organs during silvering, as in the open ocean, conditions for vision are better, even considering that at great depths light

intensity is low (Lythgoe 1979). During the transition from yellow to silver eel, increase in eye diameter and in retina surface area can be observed (Pankhurst 1982b). Moreover, structural modifications of the retina were reported, with an increase in the number of rods and a decrease in the number of cones (Pankhurst and Lythgoe 1983; Braekevelt 1985, 1988a). Finally, there is also change in visual pigment at the chromophore level with a predominance of rhodopsin in silver eels compared to porphyropsin in yellow eels (Carlisle and Denton 1959), which increases the blue light sensitivity of rods (Wood and Partridge 1993; Archer et al. 1995). All of these modifications of the visual system seem to be involved in vision in the deep sea and prepare the fish to its future reproductive migration. A similar shift in visual pigment dominance from porphyropsin to rhodopsin is observed during salmon smoltification and has been proposed as an indicator of smolt status (Alexander et al. 1994).

These data show that similar morphological modifications of skin and eyes occur during both eel silvering and salmon smoltification. These observations have traditionally made scientists consider silvering as a metamorphosis.

3.2 Gonads

The gonadosomatic index (GSI) increases from 0.3 in female yellow eels to ≥ 1.5 in silver eels with an increase of follicular diameter, thickening of the follicular wall and the appearance of many lipidic vesicles in the ooplasm (Fontaine et al. 1976; Lopez and Fontaine 1990). This increase in gonad size was shown to be a good criterion to estimate the state of advancement of the silvering process in the different eels (Marchelidon et al. 1999; Durif et al. 2005). Durif et al (2005) described five stages with physiological and morphological validation. In this study, a growth phase (stages I and II), a pre-migrating stage (stage III) and a migrating phase (stages IV and V) were defined. Stages I and II correspond to the classical denomination “yellow” stage with a $GSI < 0.4\%$; the gonads show small primary, non-vitellogenic oocytes, with a dense ooplasm and a dense nucleus with a large nucleolus (Aroua et al. 2005). Stage III corresponds to the classical denomination “intermediate” or “yellow/silver” stage with $0.4\% \leq GSI < 1.2\%$; oocytes are larger and a few lipidic vesicles are observed in the ooplasm, which indicates the initiation of the incorporation of lipid stores in the oocytes, also referred as “endogenous vitellogenesis” (Aroua et al. 2005). Stages IV and V correspond to the classical denomination “silver” stage with a $GSI \geq 1.2\%$; oocytes are further enlarged with a large nucleus and small nucleoli at a peripheral position and numerous lipid vesicles in the ooplasm, which is the oil-droplet stage of early vitellogenesis (Aroua et al. 2005). In the most advanced stage of silvering, vitellogenin can be observed in the ooplasm, as well as in the plasma, which corresponds to the start of exogenous vitellogenesis.

Considering the start of gonadal maturation, silvering should be considered as an initiation of puberty. As the development of gonads and sexual maturity are blocked at this stage and until the occurrence of oceanic reproductive migration, our group defined eel silvering as a prepuberty. These data concerning gonadal maturation show that eel silvering is quite different from salmon smoltification, which occurs before a growth phase and is not associated with changes related to reproduction.

3.3 Metabolism and digestive tract

At the silver stage, eels starve (Fontaine and Olivereau 1962) and this starvation is accompanied by a regression of the digestive tract (Han et al. 2003; Aroua et al. 2005; Durif et al. 2005). Eels need important metabolic changes to be able to accomplish their long oceanic migration, which is comprised between 4,000 km for Japanese eels (*A. japonica*: Tsukamoto, 1992) and American eel (*A. rostrata*: Tucker 1959; Mc Cleave et al. 1987) and 6,000 km for European eel (*A. anguilla*: Schmidt 1923). To permit this long oceanic migration, animals have to accumulate energy stores at the yellow stage and then

optimize the use of these stores, for both swimming and gonadal maturation. Van Ginneken and van den Thillart (2000) demonstrated, using large swim-tunnels, that for their swim effort of 6,000 km, 40% of the European eels' energy reserves are needed while the remaining 60% of their energy stores can be used for gonad development. During silvering, changes in intermediary metabolism were observed (Boström and Johansson 1972; Lewander et al. 1974; Dave et al. 1974; Barni et al. 1985; Eggington 1986; Van Ginneken et al. 2007a). Dave et al (1974) reported a slightly higher amount of unsaturated and longer fatty acids in muscle and a significantly lower level of 18:0 and 20:4n-6 in the liver of silver compared to yellow European eels. Comparable trends were more recently observed in the shortfin eel *Anguilla australis* (De Silva et al. 2002). An increase in lipid (phospholipids, free fatty acids and cholesterol) content has also been reported recently at silvering in the blood of European eels (van Ginneken et al. 2007a). According to Lewander et al (1974), a redistribution of cholesterol occurs from other tissues to the gonads in silver eel. These metabolic variations would be amplified by environmental conditions encountered during the migration, such as depth and water temperature (Theron et al. 2000), as well as by locomotor activity (van Ginneken et al. 2007b).

It is interesting to note that the switch to fasting that occurs during eel silvering appears rather definitive in comparison to other phases of fasting, observed at larval metamorphosis (in amphibians and glass eels), that are transitory and that correspond to a change of feeding behavior.

4 Neuroendocrine axes involved in the control of silvering

As indicated previously, silvering consists of various morphological, physiological and behavioural changes. Among the modified organs, some are related to sensory organs, others to hydrostatic pressure or seawater adaptation, similarly to changes observed during smoltification, which traditionally led to eel silvering being defined as a metamorphosis. However, unlike smoltification, silvering also includes some changes related to an onset of sexual maturation such as gonad development, which led to the hypothesis that silvering corresponds to a pubertal event. Puberty, the major post-embryonic developmental event in the life cycle of all vertebrates, encompasses various morpho-physiological and behavioural changes, which unlike metamorphic changes are induced by sexual steroids (for review, see Romeo 2003). While metamorphosis is mostly triggered in vertebrates by the activation of the thyrotropic axis, puberty is triggered by the activation of the gonadotropic axis. In order to assess which neuroendocrine axis may be involved in the induction of silvering, we analyzed the profiles of pituitary and peripheral hormones during the transition from yellow to silver eels.

4.1 Thyrotropic axis

Concerning eel silvering, Callamand and Fontaine (1942) observed a hyperactivity of the thyroid gland before and during the downstream migration. It was then thought that the thyroid activation was responsible for the important morphological modifications observed during silvering. Especially, concerning eye changes, some cases of exophthalmia can be observed in humans having hyperthyroidian pathology (for reviews: Bradley 2001; Wiersinga and Bartalena 2002), supporting the former hypothesis of a role of thyroid hormones in eel eye changes. Moreover, Fontaine (1953) suggested that the thyroid activation during eel silvering at the moment of the downstream migration could be responsible for the increased locomotor activity of the animals, as is observed during smoltification. In subadult American eels, elevated T4 plasma levels are correlated with increased locomotor activity under natural conditions (Castonguay et al. 1990).

Recently, our group and others have focused on the pituitary hormone controlling the synthesis of thyroid hormones, TSH (Figure 2). In contrast with the previous hypothesis, the study of the expression profiles of TSH showed a non-significant or a weak increase in TSH mRNA between yellow and silver eels (*Anguilla anguilla*: Aroua et al. 2005; *Anguilla japonica*: Han et al. 2004). Moreover, measurement of plasma levels of thyroid hormones in yellow and silver eels showed a moderate increase in thyroxine (T4) and no significant variations in triiodothyronine (T3) during silvering (*Anguilla anguilla*: Marchelidon et al. 1999; Aroua et al. 2005; *Anguilla japonica*: Han et al. 2004). These recent results suggest that the thyrotropic axis is poorly implicated in the neuroendocrine control of the silvering process. The weak variations observed on TSH mRNA and T4 plasma level could be involved in the increased activity of eels related to their migratory behavior. This role in motility may not be specific to the silver stage as thyroid hormones can also induce an increase in locomotor activity in yellow (Castonguay et al. 1990) and glass eels (Edeline et al. 2005).

Future studies should aim at investigating the brain control of pituitary TSH. Interestingly, preliminary data on eel pituitary cells suggest a role for CRH in the control of TSH, in addition to TRH (Pradet-Balade, 1998).

4.2 Somatotropic axis

Due to the implication of growth hormone (GH) in many physiological functions such as growth, metabolism, reproduction and immunity in various vertebrates, it is of interest to investigate the expression and synthesis of this hormone during silvering.

In a recent study, we focused on mRNA levels and pituitary GH content throughout the silvering process (Figure 2). We showed no significant differences in mRNA levels between yellow and silver stage, and a significant decrease of GH pituitary content (Aroua et al. 2005). These data lead us to conclude that, unlike in salmonid smoltification where GH has a strong role as a factor controlling osmoregulation and seawater adaptability (Björnsson 1997), in eel silvering the GH role is less critical, probably due to the fact that even at the yellow stage eels are able to pass into seawater.

Studies focusing on GH cell regulation have shown that basal release and synthesis of GH persist *in vitro*, in the absence of secretagogues or serum, using organ-cultured pituitaries (European eel: Baker and Ingleton 1975; Japanese eel: Suzuki et al. 1990) or primary cultures of primary cells (European eel: Rousseau et al. 1998, 1999; rainbow trout: Yada et al. 1991; turbot: Rousseau et al. 2001). All these observations lead to the suggestion that the major control of these cells *in vivo* is an inhibitory control (Rousseau and Dufour 2004). Our *in vitro* study in the European eel demonstrates that the brain inhibitory control of GH is exerted by somatostatin (SRIH) and that insulin-like growth factor 1 (IGF-1) exerts a negative feedback on GH. Thus, during silvering, the major regulation of the somatotroph cells, which are responsible of GH synthesis, would be an increase of their inhibitory control.

It is important to note that seasonal data suggest that a peak in GH and body growth during summer may occur (Durif et al. 2005). This suggests that while GH may not be involved in the control of the silvering process itself, the somatotropic axis may participate earlier in the initiation of the silvering. A similar growth surge is observed at puberty in mammals.

4.3 Corticotropic axis

Only a few studies have focused on the corticotropic axis during the transition from yellow to silver stage. It is probably because of the difficulty of sampling blood in order to measure plasma cortisol levels without stressing animals. Recently, Van Ginneken et al (2007a) demonstrated elevated cortisol levels in silver eels prior to migration. This is in

agreement with the fact that during the downstream migration, eels are fasting and it is well known that the production of cortisol is induced in response to starvation. A role of cortisol may be to permit the mobilization of energy stores needed by the fish at this critical period.

Moreover, it was shown in salmonids that cortisol promotes seawater adaptability, acting in synergy with other pituitary hormones as TSH and GH to stimulate gill ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) ATPase activity and increase chloride cell number (for review: Boeuf 1993).

In addition to the effect of cortisol on energy mobilization and seawater adaptation, we previously demonstrated in the European eel that cortisol had also a strong positive effect on LH production *in vivo* as well as *in vitro* (Huang et al. 1999). This stimulation is stronger when eels are treated by a combination of cortisol and androgens, indicating synergistic action of these hormones on LH (Huang 1998; Sbaihi 2001). It is interesting to note that while in amphibians, cortisol has a synergistic effect with thyroid hormones on metamorphosis, a synergy between cortisol and sex steroids is observed in the control of eel silvering.

The various effects of cortisol demonstrated in the eel indicate that the corticotropic axis may play an important role throughout silvering by permitting energy mobilization and probably acting at the onset of puberty. Cortisol may therefore control the metabolic challenge occurring during both metamorphosis and puberty/reproduction in teleosts. It may also act in synergy with different other hormones to induce the various morphological changes observed: with sex steroids during silvering, with THs during larval metamorphosis and with GH and TH during smoltification (Figure 4).

4.4 Gonadotropic axis

As highlighted by several authors, the silvering process is also characterized by gonadal modifications (Lopez and Fontaine 1990; Fontaine and Dufour 1991). Recent field studies clearly demonstrated an increase in gonad weight and modifications of the oocyte structure throughout the silvering process (Marchelidon et al. 1999; Aroua et al. 2005; Durif et al. 2005). In addition, measurement of sexual steroids, estrogens (E2) and androgens (T and 11-KT), in the plasma showed an increase between yellow and silver stage (*A australis* and *A dieffenbachii*: Lokman et al. 1998; *A anguilla*: Sbaihi et al. 2001; Aroua et al. 2005; *A rostrata*: Cottrill et al. 2001; *A japonica*: Han et al. 2003) (Figure 3). All these results suggest that the gonadotropic axis occupies an important position during the silvering process.

To complete the analysis of this axis, our recent studies have focused on the two pituitary hormones involved in the control of reproduction, the gonadotropins (luteinizing hormone, LH and follicle-stimulating hormone, FSH). In *A japonica* (Han et al. 2003), as well as in *A anguilla* (Aroua et al. 2005), variation on mRNA levels of the alpha and the beta subunits of the gonadotropins were observed throughout silvering. In *A japonica*, authors observed a concomitant increase in mRNA of the different subunits, LH β , FSH β and the glycoprotein alpha (GP α) (Han et al. 2003). In *A anguilla*, LH and FSH were shown to be differentially expressed during the silvering process, with an early increase in FSH β expression and a late increase of LH β expression (Aroua et al. 2005) (Figure 2). These data suggest that FSH could play an early role in the activation of gonads, while LH may have an important role later in the silvering process. Indeed, a concomitance exists between the increase in FSH expression and the start of lipid incorporation in oocytes (also called “endogenous vitellogenesis”), which suggests that FSH could be responsible for the initiation of lipidic vitellogenesis. The early increase in FSH may also be responsible for the first increase in steroid production (E2), observed in intermediate eels. In contrast, the late increase in vitellogenin (Vg) plasma levels, concomitant with the late increase in LH expression, and the slight decrease in FSH, suggests that LH may participate in the induction of Vg production and initiation of the “exogenous vitellogenesis”. Similarly, LH may also participate in the second increase in sex steroid levels, in silver eels.

In summary, among the different pituitary hormones that were studied, the gonadotropins, LH and FSH, showed the biggest variations during eel silvering.

4.5 Experimental induction of silvering changes

All these results clearly indicate that the gonadotropic axis is activated during silvering. The interesting question is to understand if this activation of the gonadotropic axis is related to the “metamorphic” changes observed during the transition from yellow to silver eel.

Previous studies on the induction of eel sexual maturation showed an amplification of anatomic changes observed during silvering (Pankhurst 1982a,b,c). Thus, morphological changes observed during silvering such as increase of eye diameter (Boëtius and Larsen 1991), enhancement of silver-colour-body and decrease of gut weight (Pankhurst and Sorensen 1984) could be further induced by gonadotropic treatments (with human chorionic gonadotropin or carp pituitary extracts).

Experimental data using exogenous sex steroids are in agreement with this involvement of gonadotropic axis in the induction of silvering. Early study showed that injections of male silver European eels with 17α -methyltestosterone resulted in enlarged eye diameter, increased skin thickness and darkened head and fins (Olivereau and Olivereau 1985). Similarly, implants of testosterone induced an increase of eye size in male silver eels (Boëtius and Larsen 1991). Moreover, a recent study in *Anguilla australis* showed that the external morphological changes such as the increase of eye diameter or the thickening of the skin observed during silvering could be induced by 11KT (Rohr et al. 2001). Finally, in our recent studies, we showed that treatment with testosterone induced a decrease in the digestive tract-somatic index (Vidal et al. 2004; Aroua et al. 2005) and an increase in ocular index (Aroua et al. 2005), while E2 has no effect (Aroua et al. 2005). All these data suggest that the silvering changes observed during our experiments are androgen-dependent. In contrast, we recently showed that 3-month-treatment of yellow eels with thyroid hormone (T3) did not induce any changes in ocular index and digestive tract-somatic index (Aroua et al. 2005). However, cortisol may have a synergistic action with steroids in this complex process of eel silvering, as we demonstrated that concomitant administration of E2, T and cortisol was most efficient in inducing the silvering of the skin in eels (Sbaihi 2001).

All these data demonstrate the involvement of androgens as crucial actors in the morpho-physiological changes of eel silvering. This is in contrast to smoltification, in which a precocious sexual maturation and sex steroid administration are able to inhibit/prevent smoltification and downstream migration (masu salmon: Ikuta et al. 1987; Munakata et al. 2001; amago salmon: Miwa and Inui 1986; Baltic salmon: Lundqvist et al. 1988; Atlantic salmon: Madsen et al. 2004).

5 Conclusions

All the external as well as internal modifications occurring during eel silvering have traditionally made scientists consider this event as a metamorphosis. However, as reviewed here, eel silvering may be primarily induced by the gonadotropic axis. There is an overall activation of this axis, with increases of gonadotropins and sex steroids. Moreover, exogenous sex steroids are able to induce peripheral morphological changes observed during this secondary metamorphosis. This let us regard silvering as a pubertal rather than a metamorphic event. The term “prepuberty” was first used by our group, as, during eel silvering, puberty is blocked and sexual maturation only occurs during the reproductive migration.

It is of great interest to note that while smoltification and silvering share many similarities in term of morphological changes, the endocrinology of these two

“secondary” metamorphoses drastically differs, with the major involvement of different neuroendocrine axes, the thyrotropic/somatotropic one for smoltification and the gonadotropic one for silvering (Figure 4). This suggests that “secondary” metamorphoses may have been acquired independently, via different endocrine mechanisms, during teleost evolution. The convergence between some morphological (skin silvering, eye size and pigments), metabolic and behavioural changes reflects that the control of the same peripheral target organs (skin, eye, muscle...) and target genes is exerted by different hormonal receptors (thyroid hormone receptors in salmon versus androgen receptors in the eel). This discovery suggests an independent recruitment of different endocrine axes for the induction of secondary metamorphoses during teleost evolution.

Other endocrine axes may participate in the control of “metamorphoses”. This is the case of the somatotropic and corticotropic axes acting in synergy with the thyrotropic axis (larval metamorphosis and smoltification) or with the gonadotropic axis (silvering). Further studies should aim at investigating the neuroendocrine interactions controlling silvering, as well as the role of environmental and internal factors in the mechanisms leading to the activation of the gonadotropic axis.

Acknowledgements. We thank S. Baloche, N. Le Belle, B. Vidal, J. Marchelidon and Drs O. Kah, Y-S Huang, M. Montero, Y. Zohar, M. Sbaihi and F-A. Weltzien, for their contributions to the studies presented in this chapter.

References

- Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B, Rosenfeld H (2005) Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 142:212-221.
- Alexander G, Sweeting R, McKeown B (1994) The shift in visual pigment dominance in the retinae of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): an indicator of smolt status. *J Exp Biol* 195:185-197.
- Alexander G, Sweeting R, McKeown B (1998) The effect of thyroid hormone and thyroid hormone blocker on visual pigment shifting in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 168:157-168.
- Allen BM (1916) Extirpation experiments in *Rana pipiens* larva. *Science* 44:755-757.
- Archer S, Hope A, Partridge JC (1995) The molecular basis for the green-blue sensitivity shift in the rod visual pigments of the European eel. *Proc Biol Sci* 262:289-295.
- Aroua S, Schmitz M, Baloche S, Vidal B, Rousseau K, Dufour S (2005) Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 82: 221-232.
- Baggerman B (1963) The effect of TSH and anti-thyroid substances on salinity preference and thyroid activity in juvenile Pacific salmon. *Can J Zool* 41:307-319.
- Baker BI, Ingleton PM (1975) Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries *in vitro*. II. Effect of salt concentration during long-term organs culture. *J Comp Physiol* 100: 269-282.
- Barbin GP (1998) The role of olfaction in homing and estuarine migratory behavior of yellow-phase American eels. *Can J Fish Aquat Sci* 55:564-575.
- Barni S, Bernocchi G, Gerzeli G (1985) Morphohistochemical changes in hepatocytes during the life cycle of the European eel. *Tissue Cell* 17:97-109.
- Bertin L (1951) Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvenile et sexualité, migrations, métamorphoses. Paris: Payot.
- Björnsson BT (1997) The biology of salmon growth hormone: From daylight to dominance. *Fish Physiol Biochem* 17: 9-24.
- Boëtius I, Larsen LO (1991) Effects of testosterone on eye size and spermiation in silver eels, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol* 82:238.
- Boeuf G (1993) Salmonid smolting: a pre-adaptation to the oceanic environment. *In* Fish Ecophysiology (Rankin JC and Jensen FB, eds). Chapman and Hall: London, pp 105-135.

- Boeuf G, Le Bail PY (1990) Growth hormone and thyroid hormones levels during smolting in different populations of Atlantic salmon. *In* Progress in Clinical Research (Epple A, Scanes CG and Steson MH, eds). Wiley-Liss Inc: New York, 342:193-197.
- Boström SL, Johansson RG (1972) Enzyme activity patterns in white and red muscle of the eel (*Anguilla anguilla*) at different developmental stages. *Comp Biochem Physiol* 42B:533-542.
- Bradley EA (2001) Graves ophthalmopathy. *Curr Opin Ophthalmol* 12:347-351.
- Braekevelt CR (1985) Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. IV. Photoreceptors of the yellow eel stage. *Anat Anz* 158:23-32.
- Braekevelt CR (1988a) Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. VI. Photoreceptors of the sexually immature silver eel stage. *Anat Anz* 166:23-31.
- Braekevelt CR (1988b) Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. VIII. Photoreceptors of the sexually mature silver eel stage. *Anat Anz* 167:1-10.
- Callamand O, Fontaine M (1942) L'activité thyroïdienne de l'anguille au cours de son développement. *Arch Zool Exp Gen* 82: 129-136.
- Carlisle DB, Denton EJ (1959) On the metamorphosis of the visual pigments of *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of the marine Biological Association of the United Kingdom* 38:97-102.
- Castonguay M, Dutil JD, Audet C, Miller R (1990) Locomotor activity and concentration of thyroid hormones in migratory and sedentary juvenile American eels. *Am Fish Soc* 119:946-956.
- Chang JP, Peter RE (1983) Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 36:351-357.
- Chang JP, Peter RE, Nahorniak CS, Sokolowska M (1984) Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. *Gen Comp Endocrinol* 55:351-360.
- Chang JP, Yu KL, Wong AO, Peter RE (1990) Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinology* 51:664-674.
- Chua D, Eales JG (1971) Thyroid function and dermal purines in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Can J Zool* 49:1557-1561.
- Comrie MM, Cutler CP, Cramb G (1999) Cloning and expression of guanylin from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochem Biophys Res Commun* 281:1078-1085.
- Copeland PA, Thomas P (1989) Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 74:474-483.
- Cottrill RA, McKinley RS, van der Kraak G, Dutil J-D, Reid KB, McGrath KJ (2001) Plasma non-esterified fatty acid profiles and 17 β -oestradiol levels of juvenile immature and maturing adult American eels in the St Lawrence River. *J Fish Biol* 59: 364-379.
- Coughlin DJ, Forry JA, McGlinchey SM, Mitchell J, Saporetto KA, Stauffer KA (2001) Thyroxine induces transitions in red muscle kinetics and steady swimming kinematics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool* 290:115-124.
- Cutler CP, Sanders IL, Hazon N, Cramb G (1995a) Primary sequence, tissue specificity and expression of Na⁺,K⁺-ATPase α 1 isoform in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comp Physiol Biochem* 111B:567-573.
- Cutler CP, Sanders IL, Hazon N, Cramb G (1995b) Primary sequence, tissue specificity and expression of Na⁺,K⁺-ATPase β 1 isoform in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Fish Physiol Biochem* 14:423-429.
- Dave G, Johansson M, Larsson A, Lewander K, Lidman U (1974) Metabolic and haematological studies on the yellow and silver shortfin phases of the European eel, *Anguilla anguilla* L. II. Fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol* 47B:583-591.
- de Jesus EG, Inui Y, Hirano T (1990) Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 79:167-173.
- de Jesus EG, Hirano T, Inui Y (1992) Gonadal steroids delay spontaneous flounder metamorphosis and inhibit T3-induced fin ray shortening *in vitro*. *Zool Sci* 9:633-638.
- de Jesus EG, Hirano T, Inui Y (1993) The antimetamorphic effect of prolactin in the Japanese flounder. *Gen Comp Endocrinol* 93:44-50.
- De Leeuw R, Goos HJ, Van Oordt PG (1986) The dopaminergic inhibition of the gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropine release: an *in vitro* study with fragments and cell suspensions from pituitaries of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Gen Comp Endocrinol* 63:171-177.

- De Silva SS, Gunasekera RM, Collins RO (2002) Some morphometric and biochemical features of ready-to-migrate silver and pre-migratory yellow stages of the shortfin eel of south-eastern Australian waters. *J Fish Biol* 61:915-928.
- Denver RJ (1993) Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin releasing hormone-like peptides. *Gen Comp Endocrinol* 91:38-51.
- Denver RJ (1999) Evolution of the corticotropin-releasing hormone signaling system and its role in stress-induced phenotypic plasticity. *Ann NY Acad Sci* 897:46-53.
- Denver RJ, Licht P (1989) Neuropeptide stimulation of thyrotropin secretion in the larval bullfrog: evidence for a common regulator of thyroid and interrenal activity during metamorphosis. *J Exp Zool* 252:101-104.
- Dodd MHI, Dodd JM (1976) The biology of metamorphosis. In *Physiology of Amphibia* (Lofts E, ed). Vol 3, pp 467-599. New York, Academic Press.
- Donaldson E, Fagerlund U, Higgs D, McBride J (1979) Hormonal enhancement of growth. In *Fish Physiology* vol VIII (Hoar WS, Randall DJ and Brett JR, eds). New York : Academic Press, pp 456-597.
- Dufour S (1994) Neuroendocrinologie de la reproduction de l'anguille: de la recherche fondamentale aux problèmes appliqués. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 335:187-211.
- Dufour S, Fontaine YA (1985) La migration de reproduction de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.): un rôle probable de la pression hydrostatique dans la stimulation de la fonction gonadotrope. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 110:291-299.
- Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA (1983) Development of a heterologous radioimmunoassay for eel (*Anguilla anguilla*) gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 49:404-413.
- Dufour S, Lopez E, Le Menn F, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA (1988) Stimulation of gonadotropin release and ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen Comp Endocrinol* 70:20-30.
- Dufour S, Bassompierre M, Montero M, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA (1991) Stimulation of pituitary gonadotropic function in female silver eels treated by a gonadoliberin agonist and dopamine antagonist. In: *Proc Ivth Int Symp Reproductive Physiology of Fish*. Pp 54-56. Edited by AP Scott, JP Sumpter, DE Kime and MS Rolfe. *FishSymp* 91, Sheffield.
- Dufour S, Burzawa-Gérard E, Le Belle N, Sbahi M, Vidal B (2003) Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In *Eel Biology* (Aida K, Tsukamoto K and Yamauchi K eds). Springer : Tokyo, pp 107-117.
- Dufour S, Weltzien FA, Sébert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C (2005) Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann NY Acad Sci* 1040:9-21.
- Durif C, Dufour S, Elie P (2005) The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J Fish Biol* 66:1025-1043.
- Eddy L, Lipner H (1976) Amphibian metamorphosis: role of thyrotropin-like hormone. *Gen Comp Endocrinol* 29:333-336.
- Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P (2004) Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. *Mar Ecol Prog ser* 282:261-270.
- Edeline E, Bardonnet A, Bolliet V, Dufour S, Elie P (2005) Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. *Horm Behav* 48:53-63.
- Eggington S (1986) Metamorphosis of the American eel, *Anguilla rostrata* LeSueur: II. Structural reorganisation of the locomotory musculature. *J Exp Zool* 238:297-309.
- Fontaine M (1953) La fonction hypophysio-thyroïdienne des poissons dans ses rapports avec leur morphologie et leur comportement. *Journal du conseil international pour l'exploitation de la mer* 19: 23-38.
- Fontaine M (1975) Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. *Adv mar Biol* 13:241-255.
- Fontaine M (1985) Action de facteurs anormaux du milieu sur l'écophysiologie d'anticipation des poissons migrants amphihalins. *Ichthyophysiologica Acta* 9:11-25.
- Fontaine M, Callamand O (1941) Sur l'hydrotropisme des civelles. *Bull Inst Océanogr* 811:1-6.
- Fontaine M, Leloup J (1960) Etude du pouvoir de concentration des iodures par la thyroïde de deux salmonidés, la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* Rich) et le jeune saumon (*Salmo salar* L.). *Arch Sci Physiol* 14:15-24.
- Fontaine M, Oliveureau M (1962) Nutrition et sexualité chez les poissons. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* 16:A125-A152.

- Fontaine M, Bertrand E, Lopez E, Callamand O (1964) Sur la maturation des organes génitaux de l'anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. *Compte Rendu hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris* 259:2907-2910.
- Fontaine YA, Dufour S (1991) The eels: from life cycle to reproductive endocrinology. *Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica* 16:237-248.
- Fontaine YA, Lopez E, Delerue-Le Belle N, Fontaine-Bertrand E, Lallier F, Salmon C (1976) Stimulation gonadotrope de l'ovaire chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) hypophysectomisée. *J Physiol, Paris* 72:871-892.
- Fontaine YA, Pisam M, Le Moal C, Rambourg A (1995) Silvering and gill "mitochondria-rich" cells in the eel, *Anguilla anguilla*. *Cell Tissue Res* 281:465-471.
- Godin JG, Dill PA, Drury DE (1974) Effects of thyroid hormones on behaviour of yearling Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J Fish Res Bd Can* 31:1787-1790.
- Gudernatsch JF (1912) Feeding experiments of tadpoles: the influence of specific organs given as food on growth and differentiation: a contribution to the knowledge of organs of internal secretion. *Wilhelm Roux' Arch Entwi Mech Org* 35: 457-483.
- Han Y-S, Liao I-C, Tzeng W-N, Huang Y-S, Yu J Y-L (2003) Serum estradiol-17 β and testosterone levels during silvering in wild Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp Biochem Physiol* 136B: 913-920.
- Han YS, Liao IC, Tzeng WN, Yu JYL (2004) Cloning of the cDNA for thyroid stimulating hormone β subunit and changes in activity of the pituitary-thyroid axis during silvering of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Mol Endocrinol* 32: 179-194.
- Haro A (2003) Downstream migration of silver-phase anguillid eels. *In Eel Biology* (Aida K, Tsukamoto K and Yamauchi K eds). Springer : Tokyo, pp 215-222.
- Hoar WS (1939) The thyroid gland of the Atlantic salmon. *J Morphol* 65: 257-295.
- Hoar WS (1988) The physiology of smolting salmonids. *In Fish Physiology*, vol 11B (Hoar WS and Randall DJ, eds). Academic Press: New York, pp 275-343.
- Hoheisel G and Sterba G (1963) Über die Wirkung von Kaliumperchlorat (KClO₄) auf Ammonoeten von *Lampetra planeri* Bloch. *Z Mikrosk.-Anat Forsch* 70 :490-516.
- Holland MC, Hassin S, Zohar Y (1998) Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozone treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biol Reprod* 59:1153-1162.
- Horton EW (1934) On the relation of the thyroid gland to metamorphosis in lampreys. *J Exp Biol* 11:247-261.
- Huang L, Schreiber AM, Soffientino B, Bengtson DA, Specker JL (1998) Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): thyroid status and the timing of gastric gland formation. *J Exp Zool* 280:413-420.
- Huang YS (1998) Rôle des stéroïdes sexuels et des hormones métaboliques dans le contrôle direct hypophysaire de l'hormone gonadotrope (GtH-II) chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*. PhD thesis University Paris VI.
- Huang YS, Rousseau K, Sbaihi M, Le Belle N, Schmitz M, Dufour S (1999) Cortisol selectively stimulates pituitary gonadotropin beta-subunit in primitive teleost, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology* 140:1228-1235.
- Huertas M, Scott AP, Hubbard PC, Canario AVM, Cerda J 2006 Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: Possible involvement of chemical communication. *Gen Comp Endocrinol* 147: 304-313.
- Ikuta K, Aida K, Okumoto N, Hanyu I (1987) Effects of sex steroids on the smoltification of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Gen Comp Endocrinol* 65:99-110.
- Inui Y, Miwa S (1985) Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen Comp Endocrinol* 60:450-454.
- Iwata M, Yamanome T, Tagawa M, Ida H, Hirano T (1989) Effects of thyroid hormones on phototaxis of chum and coho salmon juveniles. *Aquaculture* 82:329-338.
- Jegstrup IM, Rosenkilde P (2003) Regulation of post-larval development in the European eel: thyroid hormone level, progress of pigmentation and changes in behaviour. *J Fish Biol* 63:168-175.
- Kah O, Chambolle P, Thibault J, Geffard M (1984) Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. *Neurosci Letters* 48:293-298.
- Kah O, Dubourg P, Onteniente B, Geffard M, Calas A (1986) The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell Tissue Res* 244:577-582.
- Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE (1987) Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophysial pathway. *Neuroendocrinology* 45:451-458.

- Kanamori A, Brown DD (1996) The analysis of complex developmental programmes: amphibian metamorphosis. *Genes to Cells* 1:429-435.
- Kaneko T, Hasegawa S, Sasai S (2003) Chloride cells in the Japanese eel during their early stages and downstream migration. *In* Eel Biology (Aida K, Tsukamoto K and Yamauchi K, eds). Springer: Tokyo pp. 457-468.
- Katzman S, Cech JJ Jr (2001) Juvenile coho salmon locomotion and mosaic muscle are modified by 3',3',5'-tri-iodo-L-thyronine (T3). *J Exp Biol* 204 :1711-1717.
- Kitajima C, Sato T, Kawanishi M (1967) On the effect of thyroxine to promote the metamorphosis of a conger eel-preliminary report. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 33:919-922.
- Kikuyama S, Kawamura K, Tanaka S, Yamamoto K (1993) Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. *Int Rev Cytol* 145:105-148.
- Kleckner RC (1980a) Swimbladder wall guanine enhancement related to migratory depth in silver phase *Anguilla rostrata*. *Comp Biochem Physiol A* 65: 351-354.
- Kleckner RC (1980b) Swimbladder volume maintenance related to initial oceanic migratory depth in silver-phase *Anguilla rostrata*. *Science* 208: 1481-1482.
- Kleckner RC, Krueger WH (1981) Changes in swimbladder retial morphology in *Anguilla rostrata* during premigration metamorphosis. *J Fish Biol* 18: 569-577.
- Knowles EGW (1939) The influence of anterior-pituitary and testicular hormones on the sexual maturation of lampreys. *J Exp Biol* 16:535-547.
- Knowles EGW (1941) The duration of larval life in ammocoetes and attempt to accelerate metamorphosis by injections of an anterior-pituitary extract. *Proc Zool Soc Lond Ser A* 111:101-109.
- Kubota SS (1961) Studies on the ecology, growth and metamorphosis in conger eel, *Conger myriaster* (Brevoort). *J Fac Fish Mie Prefectural Univ* 5:190-370.
- Kumakura N, Okuzawa K, Gen K, Kagawa H (2003) Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of prepubertal female red seabream (*Pagrus major*). *Gen Comp Endocrinol* 131:264-273.
- Leach J (1946) Oxygen consumption of lampreys, with special reference to metamorphosis and phylogenetic position. *Physiol Zool* 19:365-374.
- Leatherland JE, Hilliard RW, Macey DJ, Potter IC (1990) Changes in serum thyroxine and triiodothyronine concentrations during metamorphosis of the Southern Hemisphere lamprey *Geotria australis*, and the effect of propylthiouracil, triiodothyronine and environmental temperature on serum thyroid hormone concentrations of ammocoetes. *Fish Physiol Biochem* 8:167-177.
- Leloup-Hatey J, Hardy A, Quérat B (1989) Responses of gonado-somatic indices and plasma levels of sex steroids to gonadotrophic stimulation in freshwater European eel at yellow and silver stages. *Gen Comp Endocrinol* 74:251.
- Lema SC, Nevitt GA (2004) Evidence that thyroid hormone induces olfactory cellular proliferation in salmon during a sensitive period for imprinting. *J Exp Biol* 207:3317-3327.
- Lewander K, Dave G, Johansson ML, Larsson A, Lidman U (1974) Metabolic and hematological studies on the yellow and silver phases of the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp Biochem Physiol B47*:571-581.
- Lin HR, Van der Kraak G, Zhou XJ, Liang JY, Peter RE, Rivier JE, Vale WW (1998) Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-a) and [D-Ala6, Pro9NEt]- luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-a), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. *Gen Comp Endocrinol* 69:31-40.
- Linard B, Bennami S, Saligaut C (1995) Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 99:192-196.
- Lintlop SP, Youson JH (1983) Concentration of triiodothyronine in the sera of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the brook lamprey, *Lampetra lamottenii* at various phases of their life cycle. *Gen Comp Endocrinol* 49:187-194.
- Lokman PM, Vermeulen GJ, Lambert JGD, Young G (1998) Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish Physiol Biochem* 19:325-338.
- Lopez E, Fontaine YA (1990) Stimulation hormonale *in vivo* de l'ovaire d'anguille européenne au stade jaune. *Reprod Nutr Dev* 30:577-582.

- Lundqvist H, Clarke WC, Johansson H (1988) The influence of precocious sexual maturation on survival to adulthood of river stocked Baltic salmon, *Salmo salar*, smolts. *Ecography* 11:60-69.
- Lythgoe JN (1979) *The ecology of vision*. Oxford: Clarendon Press.
- Madsen SS, Skovbølling S, Nielsen C, Korsgaard B (2004) 17- β estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquatic Toxicology* 68:109-120.
- Manzon RG, Denver RJ (2004) Regulation of pituitary thyrotropin gene expression during *Xenopus* metamorphosis: negative feedback is functional throughout metamorphosis. *J Endocrinol* 182:273-285.
- Marchelidon J, Le Belle N, Hardy A, Vidal B, Sbahi M, Burzawa-Gérard E, Schmitz M, Dufour S (1999) Etude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison: application à la caractérisation du stade argenté. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 355:349-368.
- Martinez AS, Cutler CP, Wilson GD, Phillips C, Hazon N, Cramb G (2005) Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression. *Biol Cell* 97:615-627.
- Mc Cleave JD, Kleckner RC, Castonguay M (1987) Reproductive sympatry of American and European eels and implications for migration and taxonomy. *Proc R Soc Lond* 1:286-297.
- McNabb FMA (1992) *Thyroid hormones*. Englewood Cliffs, Prentice Hall, pp 283.
- Miwa S, Inui Y (1985) Effects of L-thyroxine and ovine growth hormone on smoltification of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Gen Comp Endocrinol* 58:436-442.
- Miwa S, Inui Y (1986) Inhibitory effect of 17 α methyltestosterone and estradiol 17 β on smoltification of sterilized amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture* 53:21-39.
- Miwa S, Inui Y (1987a) Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 67:356-363.
- Miwa S, Inui Y (1987b) Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus*. *Cell Tissue Res* 249:117-123.
- Miwa S, Inui Y (1991) Thyroid hormone stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder. *J Exp Zool* 259:222-228.
- Miwa S, Tagawa M, Inui Y, Hirano T (1988) Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae. *Gen Comp Endocrinol* 70:158-163.
- Miwa S, Yamano K, Inui Y (1992) Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. *J Exp Zool* 261:424-430.
- Morley JE (1981) Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocrine Rev* 2:396-436.
- Munakata A, Amano M, Ikuta K, Kitamura S, Aida K (2001) The involvement of sex steroid hormones in downstream and upstream migratory behavior of masu salmon. *Comp Biochem Physiol* 129B: 661-669.
- Murr E, Sklower A (1928) Untersuchungen über die inkretorischen Organe der Fische. I. Das Verhalten der Schilddrüse in der Metamorphose des Aales. *Zeitschr Vergleichende Physiol* 7:279-288.
- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A (2007) Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *Gen Comp Endocrinol* 150:278-287.
- Okada N, Tanaka M, Tagawa M (2003) Bone development during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): differential responses to thyroid hormone. *In The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference* (Browman HI and Skiftesvik AB, eds). Institute of Marine Research, Bergen, Norway Publisher, 11 p.
- Okuzawa K (2002) Puberty in teleosts. *Fish Physiol Biochem* 26:31-41.
- Olivereau M, Olivereau J (1985) Effects of 17 α -methyltestosterone on the skin and gonads of freshwater male silver eels. *Gen Comp Endocrinol* 57: 64-71.
- Pankhurst NW (1982a) Changes in the skin-scale complex with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). *J Fish Biol* 21:549-561.
- Pankhurst NW (1982b) Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). *J Fish Biol* 21:127-140.
- Pankhurst NW (1982c) Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). *J Fish Biol* 21:417-428.
- Pankhurst NW, Lythgoe JN (1982) Structure and color of the tegument of the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 21:279-296.

- Pankhurst NW, Lythgoe JN (1983) Changes in vision and olfaction during sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 23:229-240.
- Pankhurst NW, Sorensen PW (1984) Degeneration of the alimentary tract in sexually maturing European *Anguilla anguilla* (LeSueur). *Can J Zool* 62:1143-1149.
- Pasqualini C, Vidal B, Le Belle N, Sbaihi M, Weltzien F-A, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004) Un contre-pouvoir au contrôle de la reproduction par la GnRH chez les poissons Téléostéens: l'inhibition dopaminergique. Rôle ancestral et conservation différentielle chez les Vertébrés? *Journal de la Société de Biologie* 198:61-67.
- Peter RE, Crim LW (1978) Hypothalamic lesions of goldfish: effects on gonadal recrudescence and gonadotropin secretion. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 18:819-823.
- Peter RE, Paulencu CR (1980) Involvement of the preoptic region in the gonadotropin release-inhibition in the goldfish. *Neuroendocrinology* 31:133-141.
- Peter RE, Crim LW, Goos HJTh, Crim JW (1978) Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *Gen Comp Endocrinol* 35:391-401.
- Premdas FH, Eales JG (1976) The influence of TSH and ACTH on purine and pteridine deposition in the skin of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Zool* 54:576-581.
- Pradet-Balade B (1998) Evolution de la régulation de la fonction thyroïdienne: étude chez les Téléostéens. PhD thesis University Paris XI.
- Rohr DH, Lokman PM, Davie PS, Young G (2001) 11-ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla australis*. *Comp Biochem Physiol* 130A:701-714.
- Romeo RD (2003) Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 15:1185-1192.
- Rousseau K, Dufour S (2004) Phylogenetic evolution of the neuroendocrine control of growth hormone: contribution from teleosts. *Cybium* 28: 181-198.
- Rousseau K, Huang YS, Le Belle N, Vidal B, Marchelidon J, Epelbaum J, Dufour S (1998) Long-term inhibitory effects of somatostatin and insulin-like growth factor 1 on growth hormone release by serum-free primary culture of pituitary cells from European eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 67: 301-309.
- Rousseau K, Le Belle N, Marchelidon J, Dufour S (1999) Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Neuroendocrinol* 11:385-392.
- Rousseau K, Le Belle N, Pichavant K, Marchelidon J, Chow BKC, Boeuf G, Dufour S (2001) Pituitary growth hormone secretion in turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern neuropeptides. *Neuroendocrinology* 74:375-385.
- Saglio P, Escaffre AM, Blanc JM (1988) Structural characteristics of the epidermal mucosa in yellow and silver European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 32:505-514.
- Saligaut C, Linard B, Breton B, Anglade I, Bailhache T, Kah O, Jegou P (1999) Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture* 177:13-20.
- Sbaihi M (2001) Interaction des stéroïdes sexuels et du cortisol dans le contrôle de la reproduction et du métabolisme calcique chez un téléostéen migrateur, l'anguille (*Anguilla anguilla*). PhD thesis University Paris VI.
- Sbaihi M, Fouchereau-Peron M, Meunier F, Elie P, Mayer I, Burzawa-Gérard E, Vidal B, Dufour S (2001) Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the European eel. *J Fish Biol* 59: 302-318.
- Schmidt J (1923) Breeding places and migration of the eel. *Nature* 111:51-54.
- Scholz AT (1980) Hormonal regulation of smolt transformation and olfactory imprinting in coho salmon. PhD thesis, University of Wisconsin, Madison.
- Schreiber AM, Specker JL (2000) Metamorphosis in the summer flounder, *Paralichthys dentatus*: thyroidal status influences gill mitochondria-rich cells. *Gen Comp Endocrinol* 117:238-250.
- Sébert P (2003) Fish adaptations to pressure. *In* Fish adaptation (Val AL and Kapoor BG, eds) Science Publishers, Enfield, pp73-95.
- Shi Y-B (1999) Amphibian metamorphosis. *From Morphology to Molecular Biology*. John Wiley, New York.
- Sinha VPR, Jones JW (1975) The European freshwater eel. Liverpool University Press, Liverpool.
- Soffientino B, Specker JL (2001) Metamorphosis of summer flounder, *Paralichthys dentatus*: cell proliferation and differentiation of the gastric mucosa and developmental effects of altered thyroidal status. *J Exp Zool* 290:31-40.
- Solbakken JS, Norberg B, Watanabe K, Pittman K (1999) Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Environmental Biology of Fishes* 1-2:53-65.

- Sorensen PW, Pankhurst NW (1988) Histological changes in the gonad, skin, intestine and olfactory epithelium of artificially-matured male American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur). *J Fish Biol* 32:297-307.
- Staley KB, Ewing RD (1992) Purine levels in the skin of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during parr-smolt transformation and adaptation to seawater. *Comp Biochem Physiol* 101B: 447-452.
- Sterba G (1953) Die physiologie und histogenese der schildrtlse und des thymus beim bachneunague (*Lampetra planeri* Boch = *Petromyzon planeri* Boch) als grundlagen phylogenetischer studien tlber die evolution der innersekretorischen kiemendarmderivate nebst einigen mitteilugen über die bionomie der bachneunaugen und morphologische-physiologischen untersuchungen fiber den, Kiel endarm. *Wiss Z Friedrich-Schiller-Univ. Jena Math.-Naturwiss. Reihe 3:H2*, 239-298.
- Sterba G and Schneider J (1961) Zur Wirkung von Kalium-perchlorat (KClO₄) auf Ammocoeten. *Naturwissenschaften* 48:485-486.
- Sullivan CV, Darling DS, Dickhoff WW (1987) Effects of triiodothyronine and propylthiouracil on thyroid function and smoltification of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol Biochem* 4:121-135.
- Suzuki S (1986) Induction of metamorphosis and thyroid function in the larval lamprey. *In* *Frontiers in thyroidology Vol 1* (Medeiros-Neto G and Gaitan E, eds). Plenum: New York pp. 667-670.
- Suzuki R, Kishida M, Hirano T (1990) Growth hormone secretion during longterm incubation of the pituitary of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 8: 159-165.
- Tagawa M, Miwa S, Inui Y, de Jesus EG, Hirano T (1990) Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool Sci* 7:93-96.
- Tata JR (1998) *Hormonal signalling and postembryonic development*. Springer, Berlin.
- Tata JR (2006) Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 246:10-20.
- Tesch FW (1977) *The eel: biology and management of anguillid eels*. Chapman and Hall, London.
- Tesch FW (1982) The sargasso Sea Eel Expedition 1979. *Helgoländer Meeresunters* 35:263-277.
- Tesch FW (1989) Changes in swimming depth and direction of silver eels (*Anguilla anguilla* L.) from the continental shelf to the deep sea. *Aquatic Living Resources* 2:9-20.
- Tesch FW, Westerberg H, Karlsson L (1991) Tracking studies on migrating silver eels in the Central Baltic. *Meeresforschung* 33:183 -196.
- Theron M, Guerrero F, Sébert P (2000) Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. *J Exp Biol* 203: 3019-3023.
- Thomson AJ, Sargent JR (1977) Changes in the levels of chloride cells and (Na⁺+K⁺)-dependent ATPase in the gills of yellow and silver eels adapting to seawater. *J Exp Zool* 200:33-40.
- Tsukamoto K (1992) Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature* 356:789-791.
- Tucker DW (1959) A new solution to the Atlantic eel problem. *Nature* 183:495-501.
- Van Asselt LA, Goos HJ, Smit-van Dijk W, Speetjens PAM, Van Oordt PGWJ (1988) Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 72:369-378.
- Van der Kraak G, Donaldson EM, Chang JP (1986) Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin release in coho salmon. *Can J Zool* 64:1245-1248.
- van Ginneken V, van den Thillart (2000) Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403:156-157.
- van Ginneken V, Durif C, Balm SP, Boot R, Versteegen MWA, Antonissen E, van den Thillart G (2007a) Silvering of European eel (*Anguilla anguilla* L.): seasonal changes of morphological and metabolic parameters. *Anim Biol* 57:63-77.
- van Ginneken V, Dufour S, Sbahi M, Balm P, Noorlander K, de Bakker M, Doornbos J, Palstra A, Antonissen E, Mayer I, van den Thillart G (2007b) Does a 5500-km swim trial stimulate early sexual maturation in the European eel (*Anguilla anguilla* L.)? *Comp Biochem Physiol* 147A:1095-1103.
- Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland MC, Sbahi M, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004) Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71:1491-500.
- Vilter V (1946) Action de la thyroxine sur la metamorphose larvaire de l'anguille. *CR Seances Soc Biol Ses Fil* 140:783-785.
- Westin L. (1990) Orientation mechanisms in migrating European silver eel (*Anguilla anguilla*): temperature and olfaction. *Mar Biol* 106,175 -179.

- White BA, Nicoll CS (1981) Hormonal control of amphibian metamorphosis. *In* Metamorphosis (Gilvert LI and Frieden E, eds). Plenum Press: New York, pp 363-396.
- Wiersinga WM, Bartalena L (2002) Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 12:855-860.
- Wood P, Partridge JG (1993) Opsin substitution induced in retinal rods of the eel, *Anguilla anguilla* (L.): a model for G-protein-linked receptors. *Proc R Soc Lond B* 254:227-232.
- Wright GM and Youson JH (1977) Serum thyroxine concentrations in larval and metamorphosing anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *J Exp Zool* 202:27-32.
- Yada T, Urano A, Hirano T (1991) Growth hormone and prolactin gene expression and release in the pituitary of rainbow trout in serum-free culture. *Endocrinology* 129:1183-1192.
- Yamano K, Tagawa M, de Jesus EG, Hirano T, Miwa S, Inui Y (1991) Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *J Comp Physiol B* 161:371-375.
- Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B (2003) Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol* 225:131-185.
- Young JZ and Bellerby CW (1935) The response of the lamprey to injection of anterior lobe pituitary extract. *J Exp Biol* 12:246-253.
- Youngson AF, Scott DCB, Johnstone R, Pretswell D (1985) The thyroid system's role in the downstream migration of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 45:392-393.
- Youson JH (1980) The morphology and physiology of lamprey metamorphosis. *Can J Fish Aquat Sci* 37:687-710.
- Youson JH (1988) First metamorphosis. *In* Fish Physiology Vol XI, Physiology of developing fish. Part B, Viviparity and posthatching juveniles (Hoar WS and Randall DJ, eds). Academic Press: San Diego pp. 135-196.
- Youson JH (1997) Is lamprey metamorphosis regulated by thyroid hormones? *Amer Zool* 37:441-460.
- Zohar Y, Harel M, Hassin S, Tandler A (1995) Broodstock management and manipulation of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *In* Broodstock management and Egg and Larval Quality (Bromage N and Roberts RJ, eds), pp 94-117. London, Blackwell Scientific Press.

Figure legends

Figure 1 Types of development in fish (adapted from Youson, 1988).

Figure 2 Changes in pituitary hormone expression during eel silvering (after Aroua et al. 2005). FSH=follicle-stimulating hormone; LH=luteinizing hormone; Alpha=glycoprotein alpha subunit; GH=growth hormone; TSH= thyroid stimulating hormone.

Figure 3 Changes in peripheral hormone plasma levels during eel silvering (after Aroua et al. 2005). E2=estradiol; T=testosterone; 11 KT=11 ketotestosterone; T4=thyroxine; T3=triiodothyronine.

Figure 4 Hormonal control of metamorphoses in teleost fish. Gonadotropic axis controls eel silvering, which should be considered as a “pubertal” event. Thyrotropic axis controls larval metamorphosis in fish, as in amphibians. It also controls salmon smoltification in synergy with somatotropic and corticotropic axes. Corticotropic axis acts in synergy with gonadotropic axis to control eel silvering, with thyrotropic axis to control larval metamorphosis and with both thyrotropic and somatotropic axes to control salmon smoltification. DA=dopamine; GnRH=gonadotropin-releasing hormone; FSH=follicle-stimulating hormone; LH=luteinizing hormone; TSH=thyroid stimulating hormone; SRIH=somatostatin; T4=thyroxine; T3=triiodothyronine; GH=growth hormone; IGFs=insulin-like growth factors; E2=estradiol; T=testosterone; 11 KT=11 ketotestosterone; T4=thyroxine; T3=triiodothyronine; CRH=corticotropin releasing hormone; ACTH=corticotropin. Target tissues include skin, eyes, digestive tract, muscles, cardiovascular system etc.

Figure 1

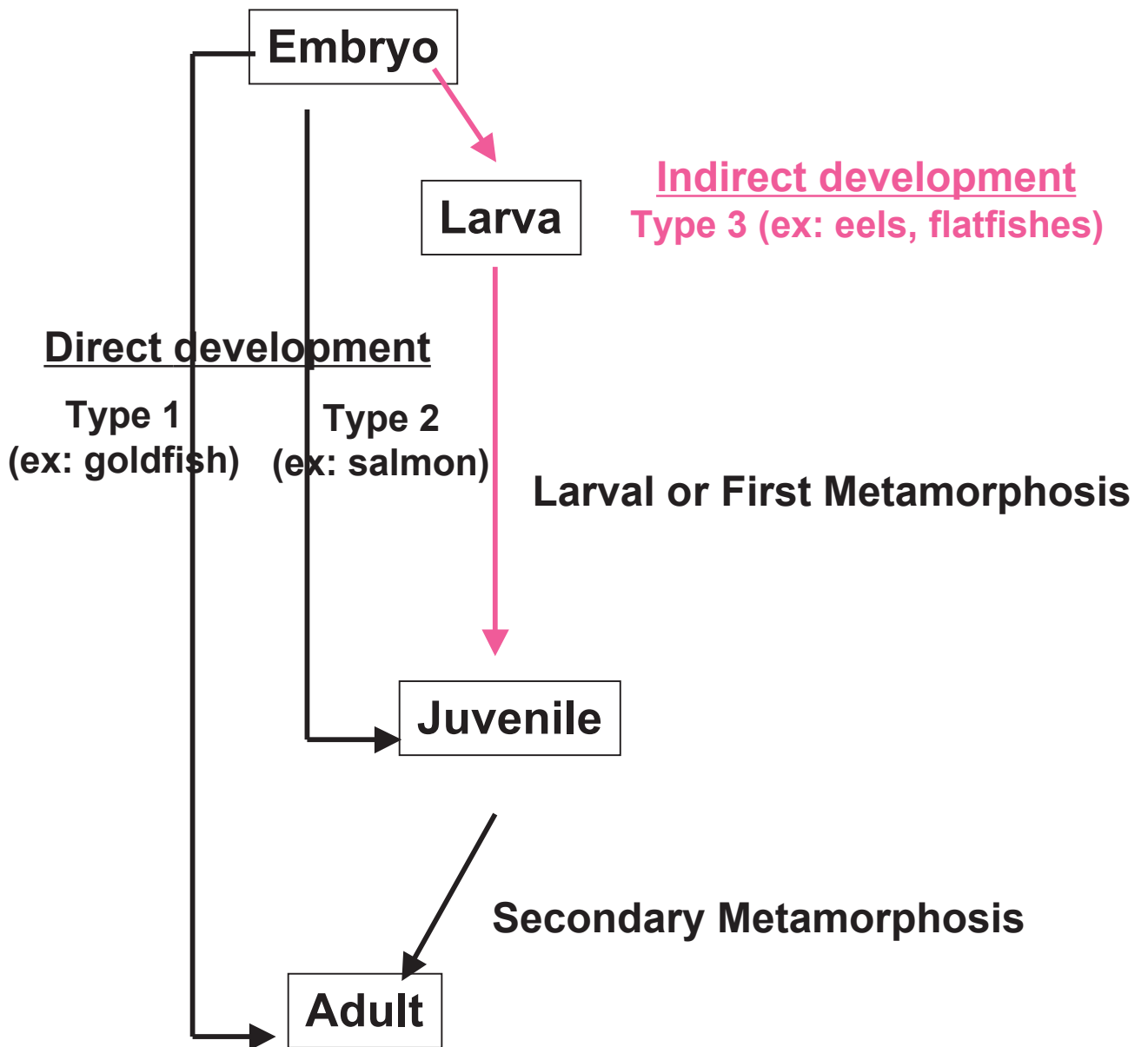


Figure 2

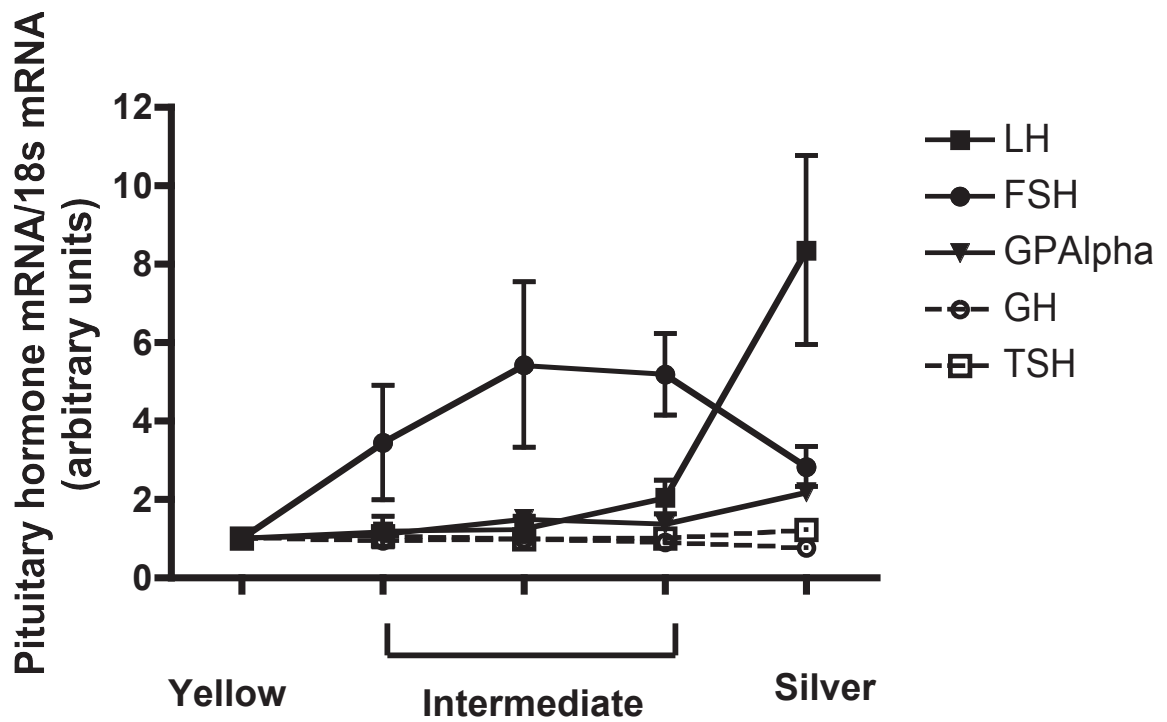


Figure 3

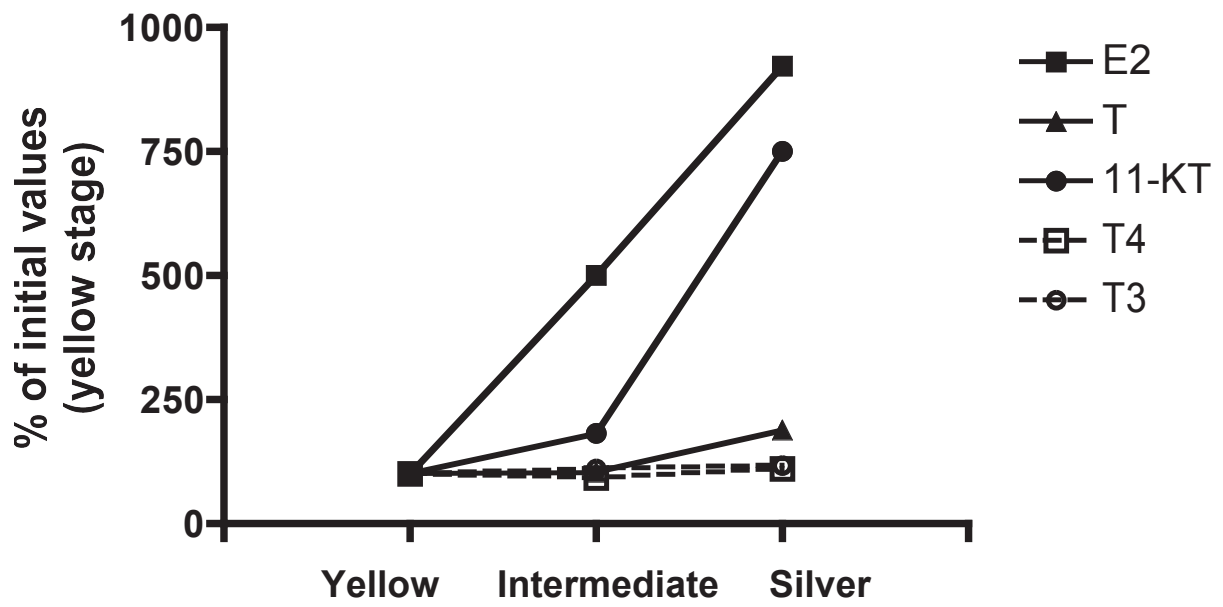
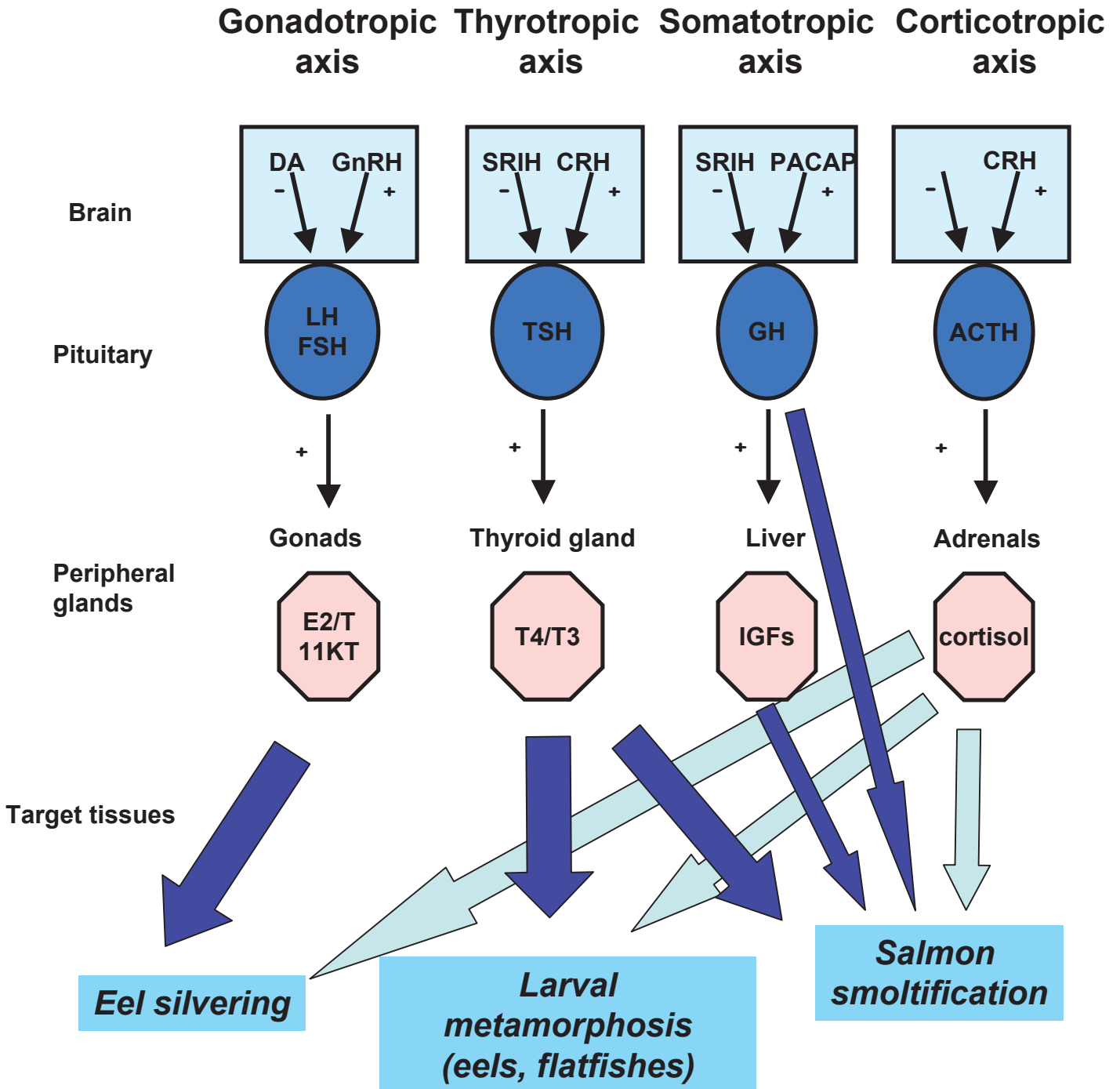


Figure 4



3. Expression différentielle des hormones gonadotropes au cours de la maturation sexuelle expérimentale et rôles des stéroïdes sexuels (article de revue 6)

3.1. Résumé de l'article

Chez les anguilles européennes mâles et femelles, des traitements gonadotropes sont capables de stimuler le développement gonadique et la production de stéroïdes sexuels endogènes. Nos études précédentes, utilisant des dosages radioimmunologiques, montraient que la maturation expérimentale induisait une régulation positive des contenus cérébraux et hypophysaires en GnRH et du contenu hypophysaire en LH, chez les deux sexes. Grâce à l'utilisation de dosages radioimmunologiques spécifiques, qui discriminent les formes de GnRH présentes chez l'anguille (mGnRH et cGnRH-II), nous avons démontré précédemment une régulation opposée des deux peptides durant la maturation expérimentale, avec une régulation positive de la forme majoritaire, le mGnRH, mais une régulation négative de cGnRH-II. Le clonage des sous-unités des gonadotropines (LH β , FSH β et la sous-unité commune GP α) chez l'anguille européenne a permis la mesure spécifique des niveaux d'ARNm. Une régulation différentielle de l'expression des sous-unités des gonadotropines est observée pendant la maturation expérimentale (Article 1), avec une forte augmentation des ARNm de LH β , une plus faible augmentation des ARNm de GP α et une diminution significative des ARNm de FSH β , chez les femelles traitées à l'extrait hypophysaire de carpe comme chez les mâles traités à la gonadotropine chorionique humaine.

Nos premières études montraient que la castration supprimait l'augmentation en mGnRH et LH chez les anguilles traitées à l'extrait hypophysaire de carpe, indiquant qu'un rétro-contrôle positif par les stéroïdes gonadiques était responsable de la régulation positive de mGnRH et de LH. Des expériences utilisant des stéroïdes sexuels exogènes ont confirmé ces résultats et ont démontré une régulation différentielle des gonadotropines (Articles 1 et 3) et des GnRHs par les oestrogènes et les androgènes. Des injections intrapéritonéales d'oestradiol (E2), mais pas de testostérone (T), sont capables d'induire une augmentation de la synthèse de LH, un effet médié par une augmentation des niveaux d'ARNm de ses sous-unités GP α et LH β . Au contraire, aucun effet d'E2 n'est observé sur les niveaux d'ARNm de FSH β , alors qu'un traitement avec T a un effet négatif significatif. Concernant GnRH, un rétro-contrôle positif œstrogène-dépendant est exercé sur mGnRH et un rétro-contrôle négatif

androgène-dépendant sur cGnRH-II. Un effet potentialisateur de T sur la stimulation par E2 des niveaux de LH et mGnRH est observé, suggérant un rôle synergique de ces hormones. Des études *in vitro* sur des cultures primaires de cellules hypophysaires d'anguille (Article 3) démontrent que E2 n'a pas d'effet stimulateur direct sur les niveaux d'ARNm de LH β et GP α , ni sur la protéine LH, et suggèrent que cette action passe sans doute par le contrôle stimulateur de l'expression de LH par GnRH. La régulation positive spécifique de mGnRH et LH durant la maturation expérimentale est probablement à relier à leur rôle possible dans l'induction des dernières étapes de la gamétogénèse (maturation ovocytaire et ovulation chez la femelle, et spermiation chez le mâle). Des études futures devraient tenir compte de ces données et avoir pour but de trouver les stimuli internes et environnementaux capables d'induire la ponte en faisant libérer mGnRH et LH.

3.2. Texte de l'article de revue 6 : « Positive and negative regulations of endogenous brain gonadoliberins and pituitary gonadotropins during eel artificial maturation. » Aroua S et al (sous presse) in 'Migration and Reproduction of the European eel' (G. van den Thillart, S. Dufour, C. Rankin, eds), Springer Publisher.

Chapter 11

The gonadoliberin(s)-gonadotropin(s) axis in the eel: expression and regulation under induced maturation and sex steroid feedbacks

Salima Aroua¹, Karine Rousseau¹, Monika Schmitz², Ching-Fong Chang³ and Sylvie Dufour¹.

¹*Museum National d'Histoire Naturelle, DMPA, UMR CNRS 5178 « Biology of Marine Organisms and Ecosystems », 7 rue Cuvier, CP 32, 75231 Paris cedex 05, France.*

²*Department of Biology, Karlstad University, S-651 88 Karlstad, Sweden.*

³*Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University, Keelung 202, Taiwan, ROC.*

Tel: +33-140793612

Fax: +33-140793618

dufour@mnhn.fr

Contents

- 1 Introduction
- 2 GnRH system
- 3 Gonadotropins
- 4 Sex steroids
- 5 Effects of sexual maturation on eel endogenous brain-pituitary gonadotropic axis
 - 5.1 Effects on gonadolibेरins
 - 5.2 Effects on gonadotropins
- 6 Effects of exogenous sex steroid treatment on endogenous brain-pituitary gonadotropic axis
 - 6.1 Effects on gonadolibेरins
 - 6.2 Effects on gonadotropins
- 7 Conclusions and applied perspectives
- References

1. Introduction

At the start of the reproductive migration towards the Sargasso sea, silver eels are still immature and remain blocked at this prepubertal stage as long as migration is prevented. To date, adult mature eels have never been caught and only experimental treatments of silver eels with gonadotropic hormones have led to the observation of sexually mature animals (Fontaine 1936; Fontaine et al. 1964). The lack of sexual maturation at the silver stage is due to a deficient production of pituitary gonadotropins (GtHs) (Dufour et al. 1983 a and b). Stimulation of synthesis and release of pituitary gonadotropin in the silver eel could be induced by combined treatments with a GnRH-agonist and a dopamine-antagonist, indicating that a double neuroendocrine blockade was responsible for the deficient pituitary gonadotropic function: a lack of endogenous stimulation by GnRH due to a deficient production of GnRH and a strong dopaminergic inhibition of GnRH action (Dufour et al. 1988, 1991; Vidal et al. 2004).

In vertebrates, it is well known that the gonadotropins (luteinizing hormone, LH and follicle stimulating hormone, FSH) are secreted by the gonadotrophs in the anterior pituitary under the control of the gonadoliberin (GnRH) produced by the brain. The gonadotropins act on the ovaries and testes to promote gametogenesis and reproductive function, and to stimulate the production of sex steroids. In turn, gonadotropin secretion and subunit gene expression are regulated by sex steroids acting either directly on the gonadotrophs or indirectly by alterations of GnRH from the hypothalamus (Gharib et al. 1990). This review will mainly focus on the differential feedbacks exerted by sex steroids on the gonadoliberins/gonadotropins system in teleost fish (especially the European eel).

2. GnRH system

To date, a total of 24 forms of GnRH have been isolated, 14 in vertebrates (12 in gnathostomes and 2 in lampreys) and 10 in invertebrates (9 in tunicates and 1 in molluscs) (for review: Gorbman and Sower 2003; Tsai 2006). Although GnRH peptides have not been isolated and sequenced from invertebrate neural structures, their presence has been suggested in cnidarians (for review: Rastogi et al. 2002; Gorbman and Sower 2003; Tsai 2006; Twan et al. 2006). In common with other neuropeptides GnRH peptides are first synthesized as a large precursor (pre-proGnRH), which includes a signal peptide (around 20-25 residues), the biologically active decapeptide GnRH, a cleavage tripeptide (Glys-Lys-Arg) and the GnRH-Associated Peptide (GAP; around 40-50 residues) (for review: Somoza et al. 2002; Lethimonier et al. 2004).

The majority of gnathostomes possess two forms of GnRH: the form in the preoptic-hypothalamic system is species-specific and highly variable, while the form in the hindbrain is consistently the chicken II form (cGnRH-II), considered as an ancestral peptide (Muske 1993). The highest diversity has been observed in teleosts (8 GnRHs isolated) (Table 1; Figure 1). In early teleosts such as the eel (Elopomorphes), chicken GnRH-II coexists with mammalian GnRH (mGnRH) (Japanese eel *Anguilla japonica*: Nozaki et al. 1985; European eel *Anguilla anguilla* : King et al. 1990), a situation similar to that found in other primitive Actinopterygii (for instance in Chondrostei such as sturgeon). In most other teleosts, cGnRH-II coexists with salmon GnRH (sGnRH) (for instance: Salmoniformes, Cypriniformes and Osteoglossiformes), with the exception of Siluriformes where catfish GnRH (cfGnRH) is present. In recent teleosts, a third GnRH form (perciformes and rockfish: sbGnRH; medaka: mdGnRH = pejerrey: pjGnRH) coexists with cGnRH-II and sGnRH. Interestingly, in more primitive species, the herring

(clupeiforme) and the whitefish (salmoniforme), a third form was also identified (herring: hrGnRH; whitefish: wfGnRH), which also coexists with cGnRH-II and sGnRH.

In the European eel, a first immunocytochemical study of the brain distribution of GnRH neurons has been performed using antibodies recognizing all forms of GnRH (Kah et al. 1989). Two GnRH molecular forms, similar to mammalian GnRH (mGnRH) and to chicken GnRH-II (cGnRH-II), were then demonstrated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and specific radioimmunoassay (RIA) (King et al. 1990). A differential distribution of these two forms was shown in the brain and the pituitary of silver eels (RIA using specific antisera: Dufour et al. 1993; immunocytochemistry: Montero et al. 1994). By RIA, we first showed that mGnRH levels were higher than cGnRH-II levels in the pituitary, olfactory lobes and tel-, di- and mes-encephalon, while the opposite was found in the posterior part of the brain (met- and myel-encephalon) (Dufour et al. 1993). These distributions were confirmed by our immunocytochemistry study in which mGnRH and cGnRH-II appeared to be produced by distinct neurons: mGnRH by neurons from olfactory bulbs, the nucleus olfactoretinalis, the ventral telencephalon, the preoptic area and the hypothalamus, while cGnRH-II was produced in a few neurons in the midbrain tegmentum (Montero et al. 1994) (Figure 2). All these data suggest differential physiological roles for the two GnRH forms in the eel. The occurrence of two GnRH forms in the eel brain was confirmed by the isolation of their cDNAs and genes in the Japanese eel (Okubo et al. 1999a,b). In addition, this study demonstrated the occurrence of three splicing variants of the messenger RNA coding for mGnRH, revealing further diversity of mGnRH potential roles and regulation (kubo et al. 1999a,b). We are currently investigating the distribution and regulation of mGnRH and cGnRH-II precursors in the European eel (Weltzien, Dufour and coworkers, in the frame of the Norway-France international cooperation).

The mGnRH molecular form, as found in the eel, is thought to have first appeared in evolution in early-emerged bony fish (Osteichthyes) based on evidence from two species of Chondrostei (reedfish and sturgeon), one species of Finglymodi (gar) and one species of Halecomorphi (*Amia*) (for review: O'Neill et al. 1998), as well as two species of primitive Teleostei (eels and butterfly fish). The question of the existence of an undiscovered third GnRH form in the eel, in addition to mGnRH and cGnRH-II, has been addressed using phylogenetic approaches. Some authors (kubo and Aida 2001) postulate that if only two GnRH forms occur in primitive teleosts such as eel and arowana (osteoglossiforme), then the eel prepro-mGnRH and the arowana prepro-sGnRH should share high homology because they would be orthologues. In contrast, as they share low homology meaning they would rather be paralogues, the authors suggest that a gene duplication giving rise to mGnRH and sGnRH occurred before the emergence of teleosts and that a third form of GnRH may still be found in the eel (Okubo and Aida 2001). Other authors (O'Neill et al. 1998) postulate that there was a substitution/replacement in the mGnRH gene after the eels evolved resulting in the sGnRH gene, based on the presence of sGnRH in four members of osteoglossiformes (*Osteoglossum bicirrosom*, *Xenomystus nigri*, *Gnathonemus petersii*, *Chitala chitala*).

GnRH peptides bind to protein G-coupled receptors (GnRH-R) composed of an extracellular N-terminal region (30-40 amino acids), a large seven amino acid transmembrane domain (280-290 amino acids), and a short cytoplasmic C-terminal tail (30-50 amino acids). Within the teleost lineage, two main types of GnRH-R (termed type I and type II) could exist, each of which may include 2 or 3 subtypes (Lethimonier et al. 2004). While the two types of GnRH-R in mammals have distinct selectivity, all the teleost types of GnRH-R have a higher affinity for cGnRH-II, followed by sGnRH and a third endogenous GnRH form (Lethimonier et al. 2004). The two types of GnRH receptors have been identified in the Japanese eel (kubo et al. 2000), and also in

goldfish (Illing et al. 1999; Peter et al. 2003), African catfish (Tensen et al. 1997; Bogerd et al. 2002) and pufferfish (Yumoto et al. 2001). The situation may be still more complex, as recently, five different subtypes of GnRH-R were detected in masu salmon (odo et al. 2003), in the spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Ikemoto and Park 2005) and in European sea bass (Moncaut et al. 2005), while three forms have been reported in medaka (Okubo et al. 2001; Okubo et al. 2003) and tilapia (Soga et al. 2005). In other species, up to now, only one type of GnRH-R was reported (rainbow trout: type II: Madigou et al. 2000; striped bass: type I: Alok et al. 2000). Further studies aiming at cloning and characterizing GnRH-R types and eventual subtypes in the European eel are clearly needed.

3. Gonadotropins

As in other vertebrates, the teleost pituitary secretes two gonadotropins (GTHs), follicle-stimulating hormone (FSH, formerly designated as GTH I in fish) and luteinizing hormone (LH, formerly GTH II in fish). GTHs are heterodimeric glycoproteins composed of a common α subunit and a hormone-specific β subunit. Our recent study in the eel using *in situ* hybridization demonstrated that LH and FSH were expressed by separate cells in the proximal pars distalis of the pituitary (Schmitz et al. 2005). In other teleost species, they are also produced in different cells in the pituitary (salmonids: Nozaki et al. 1990a; Naito et al. 1993; tuna: Kagawa et al. 1998; tilapia: Melamed et al. 1998; gilthead sea bream: Garcia Ayala et al. 2003; halibut: Weltzien et al. 2004; zebrafish: So et al. 2005). This distinct cellular source for the two GTHs in teleosts may facilitate the distinct regulation of gonadotropin synthesis and secretion. In contrast, in mammals, it was demonstrated that FSH and LH were expressed by the same gonadotropic cells (Childs et al., 1986; Liu et al., 1988). LH and FSH β subunits as well as the common glycoprotein α subunit (Gp α) have been cloned in the European eel (Quérat et al. 1990a,b; Schmitz et al. 2005) as well as in the Japanese eel (Nagae et al. 1996a). Measurement of their mRNA indicated that FSH β increased at the early steps of the silvering process, while LH β increased strongly later in the silvering process (European eel: Aroua et al. 2005; Rousseau et al. this book).

Fish gonadotropins act via binding to two gonadal gonadotropin receptors, homologous to mammalian LH receptor (LH-R) and FSH receptor (FSH-R). In contrast to the situation in mammals, the interactions are not highly specific (for review: Bogerd et al. 2005). Indeed, the catfish FSH-R is highly responsive to both catfish LH and FSH (Bogerd et al. 2001; Vischer et al. 2003), while the LH-R is rather specific to LH (Vischer and Bogerd 2003). The same situation is observed in coho salmon (Miwa et al. 1994; Yan et al. 1992). However, studies in zebrafish (Kwok et al. 2005), amago salmon (Oba et al. 1999 a,b) and sea bass (Rocha et al. 2007) showed that FSH-R was specific to FSH, while LH-R was activated by both LH and FSH. Two types of gonadotropin receptors, respectively homologous to other teleost LH-R and FSH-R have been recently cloned in the Japanese eel (Jeng et al. 2007). Measurement of their ovarian mRNA levels by absolute quantitative real time RT-PCR indicated that FSH-R expression was much higher (50-fold) than that of LH-R in the previtellogenic eel (eng et al. 2007). In immature male Atlantic salmon, FSH-R transcripts are also more abundant (8-fold) than LH-R ones (Maugars and Schmitz 2007). Maturation experiments in the eel indicated that human chorionic gonadotropin, a LH-like hormone, was unable to induce ovarian development, which can be triggered by fish pituitary extract. This suggests that eel FSH-R may have a strong specificity and does not recognize mammalian gonadotropin. Our future investigations will aim at cloning European eel gonadotropin receptors and further characterizing gonadotropin receptor selectivity in the eel (Dufour, Chang and coworkers in the frame of the Taiwan-France international cooperation).

4. Sex steroids

As in other vertebrates, the androgen, testosterone (T) and the estrogen, estradiol (E2) are present in teleost fish. In addition, 11-oxygenated androgens, especially 11-ketotestosterone (11-KT) are also detected (Borg 1994). In mature male parr and mature anadromous males, 11-ketotestosterone was even found to be the predominant androgen in the plasma (Mayer et al. 1990). Compared with adult mammals, the brain of most teleost fish is characterized by an extremely high capacity to aromatize androgens into estrogens, because of exceptionally high levels of aromatase and of high aromatase activity (Callard et al. 1978; Pasmanik and Callard 1985; for review: Pellegrini et al. 2005). Unique among vertebrates, teleost fish possess in fact three estrogen receptor (ER) subtypes (ERalpha, ER beta1, ER beta2) (Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*: Hawkins et al. 2000; zebrafish: Bardet et al. 2002; rainbow trout: Menuet et al. 2002; goldfish: Choi and Habibi 2003; European sea bass: Halm et al. 2004; fathead minnow, *Pimephales promelas*: Filby and Tyler 2005; sea bream: Pinto et al. 2006). Two androgen receptors (AR alpha and AR beta) have been identified in the eel (Ikeuchi et al. 1999) as in many teleosts (for review: Douard et al. 2004). Different studies showed the interdependence between androgen or estrogen receptors and aromatase in the brain of teleosts (for review: Pellegrini et al. 2005), with similar temporal patterns.

Low levels of androgens (mainly testosterone and 11-KT) are detected in the plasma of male silver eels (European eel: Khan et al. 1987; Japanese eel: Miura et al. 1991). Androgen production by eel testis is greatly stimulated during experimental maturation induced by hCG (European eel: Khan et al. 1987; Japanese eel: Ohta and Tanaka 1997; Japanese eel: Miura et al. 1991). In the female eel, plasma levels of T, 11-KT and E2 significantly increase between the pre-vitellogenic (yellow) and early vitellogenic (silver) stages as shown in *Anguilla anguilla*, (Sbaihi et al. 2001; Aroua et al. 2005) as well as in other eel species (*A. australis* and *dieffenbachi*: Lokman et al. 1998; *A. rostrata*: Cottrill et al. 2001; *A. japonica*: Han et al. 2003). Further increase in androgens and in E2 levels are observed during experimental maturation induced by gonadotropic (fish pituitary extract) treatments (Leloup-Hatey et al. 1988; Peyon et al. 1997). The similarity in plasma levels of androgens and estradiol is a remarkable feature in the female eel, likely related to androgen-specific regulations, as discussed in §4. Our recent study in Japanese eel showed that eel brain aromatase has a low activity compared to enzymatic activity in other teleosts (Jeng et al. 2005). This allows, in the eel, androgen-specific actions to be exerted, not only by non-aromatizable androgens such as 11-KT but also by aromatizable androgens, such as testosterone. Accordingly, testosterone-specific and estradiol-specific actions were found in the eel (see below). For the moment, no data is available concerning which androgen and/or estrogen receptor(s) is involved in the sex steroid feedbacks observed in the eel, on brain GnRHs and pituitary gonadotropins. However, concerning androgen receptors, in the Japanese eel only AR alpha is expressed in the hypothalamus (brain) (Ikeuchi et al. 1999).

5. Effects of sexual maturation on eel endogenous brain-pituitary gonadotropic axis

5.1 Effects on gonadoliberinins

As we mentioned before, silver eels remain blocked at a prepubertal stage as long as migration towards the Sargasso sea is prevented, and to date, only experimental treatments of silver eels have led to the observation of sexually mature animals (male

European eel: Fontaine 1936; female European eel: Fontaine et al. 1964). Based on these pioneer experiments in the European eel, similar treatments (hCG in males and fish pituitary extract in females) have been since currently employed to induce sexual maturation (gametogenesis and steroidogenesis) in various eel species (*Anguilla japonica*: Yamauchi et al. 1976; Ohta et al. 1997; *Anguilla rostrata*: Edel 1975; Sorensen and Winn 1984; *Anguilla dieffenbachii*: Todd 1979; Lokman and Young 2000). In the female, long-term treatment with carp pituitary extract stimulated ovarian vitellogenesis, leading to a gradual increase in gonado-somatic index, which reached up to 30-40% after several months, an index much higher than in control eels (1.5-2%) (Fontaine et al. 1964; Dufour et al. 1989, 1993; Schmitz et al. 2005; Durif et al. 2005).

Our first studies, employing antibodies recognizing all forms of GnRH, indicated a positive effect of experimental sexual maturation on total GnRH level in the brain of female or male silver eels (males treated with hCG and females with estradiol: Dufour et al. 1985; females treated with pituitary extract: Dufour et al. 1989). This effect was even more marked in the pituitary, reflecting the accumulation of GnRH in the axonal endings, which are directly innervating the adenohypophysis in the eel as in other teleosts. These data were confirmed by immunocytochemical observation (Kah et al. 1989), which indicated a strong accumulation of GnRH peptide in the pituitary and, in particular, in the axonal endings of the hypophysiotropic neurons. Moreover, castration was able to abolish the increase in brain and pituitary GnRH content, which indicates that gonadal hormones are responsible for this positive effect (Dufour et al. 1989). Later on, using specific RIAs for each native form of GnRH in the eel, we could perform more specific analyses of the effect of experimental maturation on mGnRH and cGnRH-II. We were able to demonstrate an opposite regulation of the two forms with an increase in mGnRH levels in the brain and pituitary, whereas a decrease in cGnRH-II levels in the brain was found, cGnRH-II levels being not detectable by RIA in the pituitary (Dufour et al. 1993). This opposite regulation suggests that mGnRH and cGnRH-II play drastically different roles during eel sexual maturation, and that mGnRH would play a major role in the neuroendocrine control of pituitary gonadotropins.

A differential regulation of the two GnRH forms was also observed in the goldfish and the salmon, with an increase in sGnRH but not cGnRH-II in the anterior brain and in the pituitary during natural sexual maturation (Amano et al. 1992; Rosenblum et al. 1994). In (masu) salmon brain, sGnRH genes are activated long before sexual maturation (Ando et al. 2001). In the striped bass, the levels of the two most abundant forms in the pituitary, sbGnRH and cGnRH-II, increased during the autumn and peaked prior to (for cGnRH-II) and during (for sbGnRH) the natural breeding season in March to May (Holland et al. 2001).

In sea and striped bass, pituitary GnRH-R gene expression increases according to maturation (Alok et al. 2000). Similarly, in masu salmon, the different GnRH-R genes were shown to vary with the season and after a GnRH analog treatment (Jodo et al. 2005). Even though we may also expect an increase in pituitary GnRH-R during eel induced maturation, direct data on the regulation of eel GnRH-R are missing.

5.2 Effects on gonadotropins

In the European eel, our early studies, using heterologous radioimmunoassay for carp LH β subunit, showed a large increase in pituitary LH content in artificially matured eels, namely in females treated with carp pituitary extract or in males treated with human chorionic gonadotropin (Dufour 1985). The effect of carp pituitary extract on pituitary LH content was prevented by ovariectomy (Dufour et al. 1989), and the production of sex steroids was stimulated after GtH treatment in male (Khan et al. 1987) and experimentally matured female eels (Leloup-Hatey et al. 1988). These data suggested the

involvement of gonadal hormones in the stimulation of endogenous pituitary LH during experimental maturation. In contrast, no change in plasma LH level was found in experimentally matured male eels, in spite of greatly elevated pituitary LH content (Dufour 1985). This indicates that endogenous LH synthesis but not release is stimulated during experimental maturation. The situation is likely the same in experimentally matured female eels, but the recognition of exogenous carp LH by RIA prevented the determination of endogenous LH plasma levels. Recently, the cloning of eel FSH β and LH β subunits allowed us to demonstrate that during experimental maturation induced by carp pituitary extract in females, LH and FSH undergo an opposite regulation with a large increase in LH β mRNA levels but a decrease in FSH β mRNA levels (Schmitz et al. 2005). Similarly, in males matured using hCG injections, LH β mRNA levels increased while FSH β mRNA levels decreased (Aroua et al. unpublished).

In the Japanese eel, repeated treatment with salmon gonadotropin (Sato et al. 1996) is required for the artificial induction of ovarian maturation, and stimulation of LH synthesis is only observed after treatment with salmon pituitary homogenate (Nagae et al. 1996 a and b, 1997), salmon GtH (Yoshiura et al. 1999) or sex steroids (Lin et al. 1998). An increase in both LH β and GP α mRNA levels was observed during the induction of ovarian development (Nagae et al. 1996 a and b, 1997; Yoshiura et al. 1999; Suetake et al. 2002; Saito et al. 2003a). A dramatic decrease in FSH β mRNA levels was reported in experimentally matured male and female Japanese eels, and FSH β mRNA levels were undetectable after 14 weeks of gonadotropic treatment (Yoshiura et al. 1999). Saito and colleagues found profound differences in FSH β and LH β mRNA profiles between artificially maturing Japanese eels and naturally maturing New Zealand longfinned eels *Anguilla dieffenbachii* that they correlated to differences in steroid hormone profiles (Saito et al. 2003a). Indeed, FSH β mRNA level was high at the previtellogenic stage in Japanese eels, but low in New Zealand longfinned eels and then, at the mid-vitellogenic stage, increased in New Zealand longfinned eels but decreased in Japanese eels; LH β mRNA level increased considerably at the mid-vitellogenic stage in Japanese eels, but only slightly in New Zealand longfinned eels. This reveals that the opposite variations in FSH β and LH β mRNA pituitary levels observed in artificially maturing Japanese as well as European eels, may differ considerably from their natural profiles.

Different profiles of gonadotropin expression have been observed during gametogenesis among teleost species. In salmonids, pituitary contents (rainbow trout: Suzuki et al. 1988; Nozaki et al. 1990a,b; Naito et al. 1991; amago and chum salmon: Suzuki et al. 1988) and plasma levels (rainbow trout: Suzuki et al., 1988; Prat et al., 1996; amago and chum salmon: Suzuki et al. 1988; coho salmon: Swanson et al. 1989; Atlantic salmon: Oppen-Berntsen et al. 1994; chinook salmon: Slater et al. 1994) of FSH and LH vary differently during gametogenesis, with FSH being elevated during vitellogenesis and spermatogenesis and LH increasing during final maturation. Similar results were found for FSH and LH mRNA levels (rainbow trout: Weil et al. 1995; Gomez et al. 1999; Atlantic salmon: Maugars and Schmitz 2007). These results suggest that, in salmonids, LH and FSH play separate roles during gonadal development with FSH controlling the first stages of gametogenesis and LH acting during the final steps (Swanson 1991). Salmonids are annual spawners and possess an ovary that shows synchronous oocyte development. In other teleost species such as the goldfish *Carassius auratus* (Yoshiura et al. 1997; Sohn et al. 1998), the blue gourami *Trichogaster trichopterus* (Jackson et al. 1999), the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Kajimura et al. 2001) and red seabream *Pagrus major* (Gen et al. 2000), both LH β and FSH β mRNA levels increase in parallel during gonadal maturation and spawning. These species are all multiple spawners, showing asynchronous development of oocytes throughout their spawning season. However, in another repeat spawner, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), FSH β expression peaks earlier than LH β expression (Hellqvist et al. 2006), indicating that the patterns in expression of GtHs vary

considerably, even between species that have similar patterns in ovarian development. Among perciforms, various profiles have been observed. In striped bass, *Morone saxatilis*, FSH β mRNA levels increase quickly at the onset of gonadal development and then decline to basal levels, while LH β levels remain elevated at the final stages of vitellogenic growth (Hassin et al. 1999). In contrast, in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, mRNA levels for FSH and LH increase simultaneously throughout sexual maturation and decline sharply at post-spermiation (Mateos et al. 2003).

Concerning gonadotropin receptors, in catfish ovaries, FSH-R mRNA peaks after spawning, while LH-R shows the highest expression at ovulation, suggesting that FSH-R is associated with ovarian recrudescence while LH-R plays a role in final oocyte maturation and ovulation (Kumar et al. 2001a,b). In zebrafish, while FSH-R expression increase during vitellogenesis of the first cohort of developing follicles, LH-R level becomes detectable at the beginning of vitellogenesis and steadily increases afterward with the peak level reached at the full-grown stage (Kwok et al. 2005). In male fish, FSH-R mRNA levels show an increase during early spermatogenesis, while at spermiation, the transcript levels either decrease or fluctuate (yellowtail: Rahman et al. 2003; rainbow trout: Kusakabe et al. 2006; Atlantic salmon: Maugars and Schmitz 2007). For LH-R mRNA, a steady increase is observed as testicular maturation advances (yellowtail: Rahman et al. 2003; rainbow trout: Kusakabe et al. 2006; Atlantic salmon: Maugars and Schmitz 2007). Our recent data on LH-R and FSH-R expression in the Japanese eel, using quantitative real time RT-PCR indicate an increase in the ovarian expression of both receptors during induced maturation (Jeng et al. 2007).

6. Effects of exogenous sex steroid treatment on endogenous brain-pituitary gonadotropic axis

Castration experiments in the European eel demonstrated that the increase in endogenous mGnRH and LH levels, as observed during induced maturation, resulted from a positive feedback by gonadal hormones (Dufour et al. 1991). Similarly, the involvement of gonadal hormones in the stimulation of pituitary gonadotropin during sexual maturation was demonstrated by castration experiments and gonadotropic treatments in the juvenile male rainbow trout (Crim et al. 1982; Gielen et al. 1982). Steroid measurement in various eel species have shown that the production of sex steroids (estradiol in females and androgens in both sexes) is significantly increased during eel artificial maturation (European eel: Khan et al. 1987; Japanese eel: Ijiri et al. 1995; Ohta and Tanaka 1997; New Zealand longfinned eel: Lokman et al. 2001). Their potential effect on the brain pituitary gonadotropic axis could be assessed by *in vivo* treatments with various sex steroids, as reported below.

6.1 Effects on gonadoliberin

The first demonstration of the estradiol stimulatory effect on GnRH in the European female silver eel was performed by Dufour et al (1985), using a RIA for mammalian GnRH. Later, using specific RIA for each native GnRH, we could reveal a differential regulation of mGnRH and cGnRH-II by sex steroids. We observed a stimulatory effect of estradiol on mGnRH brain and pituitary levels, while an inhibitory effect of testosterone on brain cGnRH-II level was found (Montero et al. 1995). The combined treatment with estradiol and testosterone enhanced both regulations. This indicated that steroids exert differential feedbacks on the two GnRH forms, with an estrogen-dependent control of mGnRH, an androgen-dependent control of cGnRH-II, and the possibility of a potentialization of the two types of steroids in the combined treatment (Montero et al. 1995). The increase in mGnRH levels and the decrease in cGnRH-II levels found after exogenous sex steroid treatments were in good agreement with the differential regulation of mGnRH and cGnRH-II observed in experimentally matured

female European eel (Dufour et al. 1993). This suggests a prominent role of endogenous sex steroids feedbacks in the opposite regulation of mGnRH and cGnRH-II during experimental maturation.

In the Japanese eel, contradictory results using yellow (juvenile) eels have been obtained. Indeed, while no increase in pituitary mGnRH content was observed after injection of E2 or T in female or male eels (Jeng et al. 2002), Okubo et al (2002) showed an up-regulation of mGnRH mRNAs by testosterone in males. These variations may depend upon age and stage of the eels, as well as mode and duration of sex steroid treatments.

Data from other teleosts revealed various effects and specificities of sexual steroids on GnRHs according to species and possibly physiological stage and mode of investigation, as illustrated below. However, as for mGnRH in the eel, altogether these studies indicate a stimulatory role of sex steroids on the GnRH form of the anterior brain, likely to be involved in the regulation of pituitary gonadotropins in the other teleosts (sGnRH, cfGnRH, sbGnRH).

In juvenile salmonids, T stimulated sGnRH content (*Oncorhynchus masou*: Amano et al. 1994; *Salmo trutta*: Breton et al. 1986; *Oncorhynchus mykiss*: Goos et al. 1986; Breton and Sambroni 1996). In yearling masu salmon, oral 17 α -methyltestosterone was able to activate sGnRH neurons (increase of the number of cells expressing sGnRH mRNA in the preoptic area) in future precocious males, but not in immature females (Amano et al. 1994). T and 11-KT induced an increase of GnRH levels in the brain of platyfish (*Xiphophorus maculatus*: Schreibman et al. 1986). In juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*), steroid effects were rather selective, in that only T, but not E2 or 11-oxygenated androgens, induced a precocious maturation of the cfGnRH-producing neurones in the ventral forebrain, while the mesencephalic cGnRH-II-producing neurones did not appear to be affected by these treatments (Dubois et al. 1998). In contrast, T and 11-KT were reported to induce an increase in GnRH immunoreactive cells in African catfish (Goos 1987). Dubois et al (2001) demonstrated that the onset of puberty in the male African catfish coincided with the completion of the steroid-dependent structural maturation of the cfGnRH system in the brain, but that T and E2 were also able to exert a positive influence on the amounts of cfGnRH during the later stages of pubertal development. In goldfish (*Carassius auratus*), sex steroids did not have any significant effects on the GnRH neuron activity in brain (Parhar et al. 2001). Nevertheless, other authors found that the ratio between salmon GnRH and cGnRH-II changed with sexual maturation (Rosenblum et al. 1994). In sexually immature male tilapia (*Oreochromis niloticus*), estrogen significantly increased preoptic seabream GnRH neuronal numbers, while KT failed to do so (Parhar et al. 2000). In juvenile tilapia, estrogen had no effects on mRNA levels of salmon- and chicken II-GnRH (Parhar et al. 1996). In black porgy, sex steroids (E2, T and 11-KT) significantly stimulated pituitary sbGnRH levels *in vivo*. Furthermore, the authors were able to establish primary culture of brain neurons and to demonstrate that sex steroids also stimulated the content and release of sbGnRH *in vitro* (Lee et al. 2004).

6.2 Effects on gonadotropins

Early histological studies by Olivereau and co-workers suggested that the administration of estradiol in the eel stimulated gonadotropin synthesis but not release, leading to a large accumulation of secretory granules in the pituitary gonadotropic cells (Olivereau and Chambolle 1978; Olivereau and Olivereau 1979a,b). This assumption was confirmed by RIA studies, showing a large increase in pituitary LH content in E2-treated eels, while plasma LH levels remained as low as in control fish (Dufour et al. 1983a,b). An immunocytochemical study of the cultured pituitary cells of the eel indicated an increase in the gonadotropic cell size and LH content after an *in vivo* estradiol pre-

treatment of the animals (Montero et al. 1996). In male eels, both estradiol and testosterone were effective in stimulation of pituitary LH content *in vivo*, while in the female testosterone had no or only moderate effect as compared to estradiol (Dufour et al. 1983a,b; Montero et al. 1995; Vidal et al. 2004). The effect of estrogen on pituitary LH in female European eel was shown to be mediated by an increase in mRNA coding GP α (Counis et al. 1987) and LH β subunits (Quérat et al. 1991). A synergistic effect of estradiol and testosterone on the α subunit mRNA and on the β subunit mRNA of LH (Quérat et al. 1991), as well as on pituitary radioimmunoassayable LH content (Montero et al. 1995) has been reported. The synergistic effect of testosterone on estradiol stimulation of pituitary LH expression can be compared to the similar synergy exerted on mGnRH (as discussed in § 5.1). Recent cloning of European eel FSH β cDNA (Schmitz et al. 2005) let us decipher the differential regulations of LH and FSH by sex steroids *in vivo*. Chronic *in vivo* treatment of female eels with E2 induced an increase in LH β and GP α mRNA levels but not in FSH β , while T induced a decrease in FSH β mRNA levels (Schmitz et al. 2005). We have not yet investigated the possible synergistic effects of sex steroids on FSH β . The opposite regulation of LH and FSH expression by sexual steroid treatments is in agreement with the opposite profiles of LH and FSH expression during induced maturation. This suggests that feedbacks by endogenous steroids may be responsible for the opposite changes in LH and FSH during experimental maturation.

Development of primary culture of eel pituitary cells (Montero et al. 1996) allowed us to investigate the direct effects of sexual steroids on pituitary gonadotropins. Surprisingly, these studies revealed a stimulatory effect of androgens (T and non-aromatizable androgens) but not E2 on the synthesis of LH, mediated by a specific increase in LH β but not GP α mRNA levels (Huang et al. 1997). The discrepancy between the E2 large positive effect on LH expression *in vivo* but not *in vitro*, suggests that E2 action *in vivo* is indirect, possibly via its stimulatory effect on mGnRH. In contrast, the direct stimulatory effect of androgens on LH β , as shown *in vitro*, may account for their moderate positive effect *in vivo*. Besides this direct effect, we recently demonstrated that androgens enhance *in vivo* the activity of dopaminergic neurons involved in the inhibition of eel pituitary LH (Weltzien et al. 2006). Altogether, this inhibition may counteract the direct stimulatory action of androgens on LH expression and explain their lack of, or moderate, effect *in vivo* (Aroua et al. 2007). Investigation of the regulation of FSH β expression by pituitary cells *in vitro* indicated a moderate stimulation by E2 and no significant effect of androgens (Aroua et al. 2007). These effects cannot account for the inhibition of FSH expression observed *in vivo* in androgen-treated eels. A challenging hypothesis may come from the comparison between the effects of steroids on gonadotropins and gonadoliberin *in vivo*. While an estradiol-dependent positive regulation is exerted on LH and mGnRH fitting with the hypothesis of an mGnRH-LH axis, an androgen-dependent inhibition is observed on FSH and cGnRH-II, suggesting the possibility of a cGnRH-II-FSH axis. Further investigations are clearly needed to test this hypothesis.

In Japanese eel, recent *in vitro* studies demonstrated that sex steroid treatment (T, E2 and 11-KT) suppressed FSH β subunit mRNA levels (cultured eel pituitary: Mitsuhashi et al. 2000), while E2 was able to induce LH synthesis (organ-cultured pituitary glands: Saito et al. 2003b). For LH, this discrepancy in the data could be explained by the differences in the methods used (organ cultures still possess neuronal endings) or in the species studied.

In other teleosts, there is evidence for both positive and negative effects of sex steroids on gonadotropin production, depending on the reproductive stages of the fish. For instance, in goldfish, a stimulatory effect of T on LH mRNA levels has been shown (Huggard et al. 1996; Sohn et al. 1998). This stimulatory effect was less effective in fish in which gonadal maturation had been initiated in comparison to those in immature fish (Kobayashi and Stacey 1990; Huggard et al. 1996; Sohn et al. 1998), which demonstrates

a difference in sensitivity of the pituitary gland to sex steroids depending on the maturity of the fish. *In vitro*, the levels of LH β mRNA were stimulated by T (both sexually immature and mature fish: Huggard et al. 1996; immature fish: Sohn et al. 2001). Concerning FSH, *in vivo* investigations showed that sex steroids exerted a strong inhibitory effect on FSH β mRNA levels in sexually immature and maturing goldfish (Sohn et al. 1998; Kobayashi et al. 2000), while no effect was observed *in vitro* on cells of immature, recrudescing, mature and regressed fish (Sohn et al. 2001), which indicates a possible indirect action of T on FSH. In juvenile salmonids, a number of studies have demonstrated that E2 increased pituitary levels of LH and LH β mRNA (Crim et al. 1981; coho salmon: Dickey and Swanson 1998; rainbow trout: Trinh et al. 1986; Xiong et al. 1994). In contrast, negative or no effects of sex steroids on LH have been reported in mature fish (Billard et al. 1977; Larsen and Swanson 1997; Xiong et al. 1994). Xiong et al. (1994) studied the effect of sex steroids on LH β gene expression in cultured pituitary cells of chinook salmon: several estrogen-responsive elements (EREs) were characterized and a proximal ERE was suggested to be involved in the positive feedback of steroids in juvenile fish, but not in mature ones. In contrast, *in vitro* treatment of pituitary cells from immature rainbow trout with E2 had no effect on the amounts of FSH β mRNA (Xiong et al. 1994). Concerning the regulation of FSH *in vivo*, steroids had mostly negative but also some positive effects, which could be observed depending on the reproductive stage of fish. T and E2 reduced FSH plasma levels in immature coho salmon (Larsen and Swanson 1997; Dickey and Swanson 1998) and Atlantic salmon (Borg et al. 1998). In goldfish, a stimulatory effect of T on LH mRNA levels has been shown (Huggard et al. 1996; Sohn et al. 1998). This stimulatory effect was less effective in fish in which gonadal maturation has been initiated in comparison to those in immature fish (Kobayashi and Stacey 1990; Huggard et al. 1996; Sohn et al. 1998), which demonstrates a difference in sensitivity of the pituitary gland to sex steroids depending on the maturity of the fish. *In vitro*, the levels of LH β mRNA were stimulated by T (both sexually immature and mature fish: Huggard et al. 1996; immature fish: Sohn et al. 2001). Concerning FSH, *in vivo* investigations showed that sex steroids exert a strong inhibitory effect on FSH β mRNA levels in sexually immature and maturing goldfish (Sohn et al. 1998; Kobayashi et al. 2000), while no effect was observed *in vitro* on cells of immature, recrudescing, mature and regressed fish (Sohn et al. 2001), which indicates a possible indirect action of T on FSH. In the sea bass, like in goldfish, implantation with E2, T or DHT suppressed basal FSH β expression, while slightly increased LH β expression (Mateos et al. 2002).

Altogether, these data indicate that sex steroids have in general a stimulatory effect on LH and negative one on FSH in immature fish from various teleost species, including the eel, even though the steroid specificity and mechanism of these actions may differ according to the species.

7. Conclusions and applied perspectives

In the eel as in other teleosts, but differently from mammals, LH and FSH are expressed by different cells in the proximal pars distalis of the pituitary. Their differential regulation by gonadal steroids, as shown during experimental maturation or after sex steroid treatment, with a large increase in LH and a decrease in FSH, suggests that LH and FSH play different roles in eel reproduction. We hypothesize (see Chapter 3) that FSH may be responsible for the initiation of lipidic vitellogenesis (“endogenous vitellogenesis”), LH and FSH may participate in the induction of vitellogenin production and “exogenous vitellogenesis”, and LH may control the final steps (oocyte maturation and ovulation). Similarly, LH could be mostly involved in the final stages of spermatogenesis in male.

The differential distribution and regulation of eel GnRH native forms (mGnRH and cGnRH-II) in the brain also leads to the conclusion of different physiological roles.

The large increase in pituitary mGnRH levels in experimentally matured eels or steroid-treated eels suggest the prime implication of mGnRH in the neurohormonal control of LH surge.

However, one should keep in mind that these opposite regulations (mGnRH-LH / cGnRH-II-FSH) (Figure 3) are observed in experimental conditions that bypass the natural brain-pituitary control. They may therefore differ from the natural pattern of GnRH peptides and pituitary gonadotropins during spontaneous eel sexual maturation. In particular, the drop of FSH may be an artefactual consequence of sex steroid feedbacks in the absence of other natural triggering factors. Whatever the situation is, we could already take advantage of the large increase in LH and mGnRH induced by the sex steroid feedback by suggesting innovative protocols for inducing the last steps of gametogenesis in the eel. For instance, in experimentally-matured eels, short term treatments with GnRH agonists and dopamine antagonists could be applied to induce the release of pituitary LH and mimic the endogenous LH ovulatory peak. Similarly, factors able to trigger GnRH release, such as pheromones, could be applied to induce mGnRH-LH ovulatory peak. These alternative methods could lead to more physiological levels of hormones inducing final oocyte maturation and ovulation, favouring a better quality of gametes and larvae. Concerning FSH, future studies should aim at investigating which factors could maintain its expression in spite of the negative steroid feedback. Our ongoing studies indicate a strong stimulatory role of activin on eel FSH β expression. One other major issue would be to study the localization and expression of GnRH-R and gonadotropin receptors during experimental maturation as well as their regulation by sex steroids. All this knowledge would give new perspectives for reproductive control and long-term aquaculture of eels.

Acknowledgements. We thank S. Baloche, N. Le Belle, B. Vidal and Drs O. Kah, Y-S Huang, M. Montero, Y. Zohar, M. Sbaihi and F-A. Weltzien for their contributions to the studies presented in this chapter.

References

- Alok D, Hassin S, Sampath KR, Trant JM, Yu K, Zohar Y (2000) Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: functional expression in a fish cell line. *Mol Cell Endocrinol* 168:65-75.
- Amano M, Aida K, Okumoto N, Hasegawa Y (1992) Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in the female Masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. *Zool Sci* 9:375-386.
- Amano M, Hyodo S, Urano A, Okumoto N, Kitamura S, Ikuta K, Suzuki Y, Aida K (1994) Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17α -methyltestosterone administration in female masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 95:374-380.
- Ando H, Sasaki Y, Okada H, Urano A (2001) Prepubertal increases in the levels of two salmon gonadotropin-releasing hormone mRNAs in the ventral telencephalon and preoptic area of masu salmon. *Neurosci Lett* 307:93-96.
- Aroua S, Schmitz M, Baloche S, Vidal B, Rousseau K, Dufour S (2005) Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 82:221-232.
- Aroua S, Weltzien FA, Le Belle N, Dufour S (2007) Development of real-time rt-pcr assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids. *Gen Comp Endocrinol* 153:333-343.
- Bardet PL, Horard B, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Vanacker JM (2002) Characterization of estrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol* 28:153-163.
- Billard R, Richard M, Breton B (1977) Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 33:163-165.
- Bogerd J, Li KW, Janssen-Dommerholt C, Goos H (1992) Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem Biophys Res Commun* 187:127-134.
- Bogerd J, Blomenröhr M, Andersson E, van derPutten HHAGM, Tensen CP, Vischer HF, Granneman JCM, Janssen-Dommerholt C, Goos HJTh, Schulz RW (2001) Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 64:1633-1643.
- Bogerd J, Diepenbroek WB, Hund E, van Oosterhout F, Teves AC, Leurs R, Blomenrohr M (2002) Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. *Endocrinology* 143:4673-4682.
- Bogerd J, Granneman JCM, Schulz RW, Vischer HF (2005) Fish FSH receptors bind LH: how to make the human FSH receptor to be more fishy? *Gen Comp Endocrinol* 142:34-43.
- Borg B (1994) Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol* 109C:219-245.
- Borg B, Antonopoulou E, Mayer I, Andersson E, Berglund I, Swanson P (1998) Effects of gonadectomy and androgens treatments on pituitary and plasma levels of gonadotropins in mature male Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr: positive feedback control of both gonadotropins. *Biol Reprod* 58:814-820.
- Breton B, Sambroni E (1996) Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 101:155-164.
- Breton B, Motin A, Billard R, Kah O, Geoffre S, Percigoux G (1986) Immunoreactive gonadotropin releasing hormone like material in the brain and pituitary gland during the periovulatory period in the brown trout (*Salmo trutta* L.): relationships with the plasma and pituitary gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 61:109-119.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ (1978) Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology* 103:2283-2290.
- Childs GV, Hazum E, Amsterdam A, Limor R, Naor Z (1986) Cytochemical evidence for different routes of gonadotropin-releasing hormone processing by large gonadotropes and granulosa cells. *Endocrinology* 119:3329-3338.
- Choi CY, Habibi HR (2003) Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 204:169-177.

- Cottrill RA, McKinley RS, van der Kraak G, Dutil J-D, Reid KB, McGrath KJ (2001) Plasma non-esterified fatty acid profiles and 17 β -oestradiol levels of juvenile immature and maturing adult American eels in the St Lawrence River. *J Fish Biol* 59:364-379.
- Counis R, Dufour S, Ribot G, Quérat B, Fontaine YA, Jutisz M (1987) Estradiol has inverse effects on pituitary glycoprotein hormone α -subunit messenger ribonucleic acid in the immature European eel and the gonadectomized rat. *Endocrinology* 121:1178-1184.
- Crim LW, Peter RE, Billard R (1981) Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen Comp Endocrinol* 44:374-381.
- Crim LW, Billard R, Genge PD, Idler DR (1982) The influence of immature gonads on onset of gonadotropic hormone accumulation in the juvenile rainbow trout pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 48:161-166.
- Dickey JT, Swanson P (1998) Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Mol Endocrinol* 21:291-306.
- Douard V, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Guiguen Y (2004) Molecular evolution of androgen receptors in fish. *Fish Physiol Biochem* 28:207-208.
- Dubois EA, Florijn MA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJTh (1998) Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *Gen Comp Endocrinol* 112:383-393.
- Dubois EA, Slob S, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ (2001) Gonadal steroids and the maturation of the species-specific gonadotropin-releasing hormone system in brain and pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comp Biochem Physiol* 129B:381-387.
- Dufour S (1985) La fonction gonadotrope de l'anguille européenne, *Anguilla anguilla* L., au stade argenté (au moment du départ pour la migration de reproduction): les mécanismes de son blocage et sa stimulation expérimentale. PhD thesis University Paris VI.
- Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA (1983a) Development of a heterologous radioimmunoassay for eel (*Anguilla anguilla*) gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 49:404-413.
- Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA (1983b) Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen Comp Endocrinol* 52:190-197.
- Dufour S, Fontaine YA, Kerdelhué B (1985) Increase in brain and pituitary radioimmunoassayable gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the European silver eel treated with sexual steroid or human chorionic gonadotropin. *Neuropeptides* 6:495-502.
- Dufour S, Lopez E, Le Menn F, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA (1988) Stimulation of gonadotropin release and ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen Comp Endocrinol* 70:20-30.
- Dufour S, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA (1989) Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol Biochem* 7:157-162.
- Dufour S, Bassompierre M, Montero M, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA (1991) Stimulation of pituitary gonadotropic function in female silver eels treated by a gonadoliberin agonist and dopamine antagonist. In: *Proc Ivth Int Symp Reproductive Physiology of Fish*. Pp 54-56. Edited by AP Scott, JP Sumpter, DE Kime and MS Rolfe. *FishSymp* 91, Sheffield.
- Dufour S, Montero M, Le Belle N, Bassompierre M, King JA, Millar RP, Peter RE, Fontaine YA (1993) Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol Biochem* 11:99-106.
- Durif C, Dufour S, Elie P (2005) The silvering process of the European eel: a new classification from the yellow resident stage to the silver migrating stage. *J Fish Biol* 66: 1-19.
- Edel RK (1975) The induction of maturation of female American eels through hormone injections. *Helgoland Marine Research* 27:131-138.
- Filby AL, Tyler CR (2005) Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biol Reprod* 73:648-662.
- Fontaine M (1936) Sur la maturation complète des organes génitaux de l'anguille mâle et l'émission spontanée de ses produits sexuels. *CR Acad Sci Paris* 202 :1312-1315.

- Fontaine M, Bertrand E, Lopez E, Callamand O (1964) Sur la stimulation des organes génitaux de l'anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des œufs en aquarium. CR Acad Sci, Paris, 259:2907-2910.
- Garcia Ayala A, Villaplana M, Garcia Hernandez MP, Chaves Pozo E, Aquilleiro B (2003) FSH-, and LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L (Teleostei). An immunocytochemical study. Gen Comp Endocrinol 134:72-79.
- Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, Kagawa H (2000) Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. Biol Reprod 63:308-319.
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik Man Chin WW (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocrine Rev 11:177-199.
- Gielen JT, Goos HJ, Peute J, Van den Bosch RA, Van Oordt PG (1982) The brain-pituitary-gonadal axis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: gonadal hormones and the maturation of gonadotropic cells. Cell Tissue Res 225:45-56.
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B, Le Gac FL (1999) Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 113:413-428.
- Goos HJTh (1987) Steroid feedback on pituitary gonadotropin secretion. In : Idler DR, Crim LW, Walsh JM (Eds), Proceeding of Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. St John's, Newfoundland, Canada, pp16-20.
- Goos HJTh, De Leeuw R, Cook H, Van Oordt PGWJ (1986) Gonadotropic hormone-releasing hormone (GnRH) bioactivity in the brain of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*: the effect of testosterone. Gen Comp Endocrinol 64:80-84.
- Gorbman A, Sower SA (2003) Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. Gen Comp Endocrinol 134:207-213.
- Halm S, Martinez-Rodriguez G, Rodriguez L, Prat F, Mylonas CC, Carrillo M, Zanuy S (2004) Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER alpha, ER beta 1 and ER beta 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Mol Cell Endocrinol 223:63-75.
- Han Y-S, Liao I-C, Tzeng W-N, Huang Y-S, Yu J Y-L (2003) Serum estradiol-17 β and testosterone levels during silvering in wild Japanese eel *Anguilla japonica*. Comp Biochem Physiol 136B: 913-920.
- Hassin S, Holland MCH, Zohar Y (1999) Ontogeny of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression during pubertal development in the female striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei). Biol Reprod 61:1608-1615.
- Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proc Natl Acad Sci USA 97:10751-10756.
- Hellqvist A, Schmitz M, Mayer I, Borg B (2006) Seasonal changes in expression of LH- β and FSH- β in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Gen Comp Endocrinol 145:263-269.
- Holland MC, Hassin S, Zohar Y (2001) Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. J Endocrinol 169:527-538.
- Huang YS, Schmitz M, Le Belle N, Chang CF, Quérat B, Dufour S (1997) Androgens stimulate gonadotropin-II β -subunit in eel pituitary cells in vitro. Mol Cell Endocrinol 131:157-166.
- Huggard D, Khakoo Z, Kassam G, Mahmoud SS, Habibi HR (1996) Effect of testosterone on maturational gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. Biol Reprod 54:1184-1191.
- Ijiri S, Kazeto Y, Takeda N, Chiba H, Adachi S, Yamauchi K (1995) Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 135:3-16.
- Ikemoto T, Park MK (2005) Identification and molecular characterization of three GnRH ligands and five GnRH receptors in the spotted green pufferfish. Mol Cell Endocrinol 242:67-79.
- Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y (1999) cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. J Biol Chem 274:25205-25209.
- Illing N, Troskie BE, Nahorniak CS, Hapgood JP, Peter RE, Millar RP (1999) Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). Proc Natl Acad Sci USA 96:2526-2531.

- Jackson K, Goldberg D, Ofir M, Abraham M, Degani G (1999) Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic β subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J Mol Endocrinol* 23:177-187.
- Jeng SR, Chen GR, Lai JY, Huang YS, Dufour S, Chang CF (2002) Regulation of pituitary gonadotropin II and growth hormone content by sex steroids and pituitary extract in the aquacultured Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 209:319-332.
- Jeng SR, Dufour S, Chang CF (2005) Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Exp Zool* 303A:802-812.
- Jeng SR, Yueh WS, Chen GR, Lee YH, Dufour S, Chang CF (2007) Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gen Comp Endocrinol* 154:161-173.
- Jodo A, Ando H, Urano A (2003) Five different types of putative GnRH receptor gene are expressed in the brain of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Zool Sci* 20:1117-1125.
- Jodo A, Kitahashi T, Taniyama S, Ueda H, Urano A, Ando H (2005) Seasonal changes in expression of genes encoding five types of gonadotropin-releasing hormone receptors and responses to GnRH analog in the pituitary of masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 144:1-9.
- Kagawa H, Kawazoe I, Tanaka H, Okuzawa K (1998) Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GtH I and GtH II) in the pituitary of bluefin tuna, *Thunnus thunnus*. *Gen Comp Endocrinol* 110:11-18.
- Kah O, Dufour S, Baloché S, Breton B (1989) The GnRH systems in the brain and pituitary of normal and hCG-treated European silver eels. *Fish Physiol Biochem* 6:279-284.
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, Aida K (2001) cDNA cloning of two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 122:117-129.
- Khan IA, Lopez E, Leloup-Hatey J (1987) Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen Comp Endocrinol* 68:91-103.
- King JA, Dufour S, Fontaine YA, Millar RP (1990) Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken II GnRH in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Peptides* 11:507-514.
- Kobayashi M, Stacey NE (1990) Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool Sci* 7:715-721.
- Kobayashi M, Sohn YC, Yoshiura Y, Aida K (2000) Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Sci* 66:223-231.
- Kumar RS, Ijiri S, Trant JM (2001a) Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors : 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. *Biol Reprod* 64:1010-1018.
- Kumar RS, Ijiri S, Trant JM (2001b) Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors : 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor. *Biol Reprod* 65:710-717.
- Kusakabe M, Nakamura I, Evans J, Swanson P, Young G (2006) Changes in mRNAs encoding steroidogenic regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. *J Endocrinol* 189:541-554.
- Kwok HF, So WK, Wang Y, Ge W (2005) Zebrafish gonadotropins and their receptors : I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development. *Biol Reprod* 72:1370-1381.
- Larsen DA, Swanson P (1997) Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 108:152-160.
- Lee YH, Du JL, Shih YS, Jeng SR, Sun LT, Chang CF (2004) In vivo and in vitro sex steroids stimulate seabream gonadotropin-releasing hormone content and release in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Gen Comp Endocrinol* 139:12-19.
- Leloup-Hatey J, Hardy A, Nahoul K, Quérat B, Zohar Y (1988) Influence of gonadotrophic treatment upon the ovarian steroidogenesis in European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). INRA Paris, Les colloques de l'INRA, N°44, Reproduction chez les poissons, Bases fondamentales et appliquées en endocrinologie et génétique. Tel-Aviv, Nov 10-12, pp 127-130.
- Lescheid DW, Powell JFF, Fischer WH, Park M, Craig A, Bokovskaya O, Barannikova IA, Sherwood NM (1995) Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) identified by primary structure in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*. *Regul Peptides* 55:299-309.

- Lethimonier C, Madigou T, Munoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O (2004) Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 135:1-16.
- Lin HR, Xie G, Zhang LH, Wang XD, Chen LX (1998) Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica* T & S). *Bull Fr Peche Piscic* 349:163-176.
- Liu YC, Kato Y, Inoue K, Tanaka S, Kurosumi K (1988) Co-localization of LH β and FSH β mRNAs in the porcine anterior pituitary by *in situ* hybridization with biotinylated probes. *Biochem Biophys Res Commun* 154:80-84.
- Lokman PM, Young G (2000) Induced spawning and early ontogeny of New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*). *New Zeal J Mar Fresh Res* 34:135-145.
- Lokman PM, Vermeulen GI, Lambert JGD, Young G (1998) Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish Physiol Biochem* 19:325-338.
- Lokman PM, Wass RT, Suter HC, Scott SG, Judge KF, Young G (2001) Changes in steroid hormone profiles and ovarian histology during salmon pituitary-induced vitellogenesis and ovulation in female New Zealand longfinned eels, *Anguilla dieffenbachii*. *J Exp Zool* 289:119-129.
- Madigou T, Mananos-Sanchez E, Hulshof S, Anglade I, Zanuy S, Kah O (2000) Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 63:1857-1866.
- Mateos J, Mananos E, Carrillo M, Zanuy S (2002) Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp Biochem Physiol B* 132:75-86.
- Mateos J, Mananos E, Martinez-Rodriguez G, Carrillo M, Quérat B, Zanuy S (2003) Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 133:216-232.
- Maugars G, Schmitz M (2006) Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Gen Comp Endocrinol* 149:108-117.
- Maugars G, Schmitz M (2007) Expression of gonadotropins and gonadotropin receptor genes during early sexual maturation in male Atlantic salmon parr. *Mol Reprod Dev* Epub ahead of print.
- Mayer I, Berglund I, Rydevik M, Borg B, Schulz R (1990) Plasma levels of five androgens and 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone in immature and mature male Baltic salmon (*Salmo salar*) parr, and the effects of castration and androgen replacement in mature parr. *Can J Zool* 68:263-267.
- Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z (1998) Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp Biochem Physiol* 119:325-338.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 66:1881-1892.
- Mitsuhashi E, Saito K, Matsubara H, Hirai T, Adachi S, Yamauchi K (2000) Effects of sex steroids on FSH β and LH β mRNA levels in cultured pituitary of Japanese eel. *Proc Jpn Soc Comp Endocrinol* 15:14.
- Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, Takahashi H (1991) Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool Sci* 8:63-73.
- Miwa S, Yan L, Swanson P (1994) Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* autoradiography. *Biol Reprod* 50:629-642.
- Moncaut N, Somoza G, Power DM, Canario AV (2005) Five gonadotropin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. *J Mol Endocrinol* 34:767-779.
- Montero M, Vidal B, King JA, Tramu G, Vandesande F, Dufour S, Kah O (1994) Immunocytochemical localization of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *J Chem Neuroanat* 7:227-241.
- Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP, Dufour S (1995) Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61:525-535.

- Montero M, Le Belle N, Vidal B, Dufour S (1996) Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *Gen Comp Endocrinol* 104:103-115.
- Muske LE (1993) Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav Evol* 42:215-230.
- Nagae M, Todo T, gen K, Kato Y, Young G, Adachi S, Yamauchi K (1996a) Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone α - and gonadotropin II β -subunits of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate. *J Mol Endocrinol* 16:171-181.
- Nagae M, Adachi S, Yamauchi K (1996b) Changes in transcription of pituitary glycoprotein hormone α and gonadotropin II β subunits during ovarian development induced by repeated injections of salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17:179-186.
- Nagae M, Adachi S, Yamauchi K (1997) Changes in transcription of pituitary glycoprotein hormones α and gonadotropin II β subunits during ovarian development induced by repeated injections of salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17:179-186.
- Naito N, Hyodo S, Okumoto N, Urano A, Nakai Y (1991) Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell Tissue Res* 266:457-467.
- Naito N, De Jesus EG, Nakai Y, Hirano T (1993) Ontogeny of pituitary cell types and the hypothalamo-hypophysial relationship during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Cell Tissue Res* 272:429-437.
- Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM (1992) Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci* 3:17-22.
- Nozaki M, Fujita I, Saito N, Tsukahara T, Kobayashi H, Ueda K, Oshima K (1985) Distribution of LHRH-like immunoreactivity in the brain of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) with special reference to the nervous terminals. *Zool Sci* 2:537-548.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K, Kawauchi H (1990a) Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins GTH I and GTH II. *Gen Comp Endocrinol* 77:348-357.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K, Kawauchi H (1990b) Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen Comp Endocrinol* 77:358-367.
- Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Yoshikuni M, Kawauchi H, Nagahama Y (1999a) Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 263:584-590.
- Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Yoshikuni M, Kawauchi H, Nagahama Y (1999b) The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 265:366-371.
- Ohta H, Tanaka H (1997) Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 153:123-134.
- Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Hirose K (1997) Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17:163-169.
- Okubo K, Aida K (2001) Gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in a primitive teleost, the arowana: phylogenetic evidence that three paralogous lineages of GnRH occurred prior to the emergence of teleosts. *Gen Comp Endocrinol* 124:125-133.
- Okubo K, Suetake H, Aida K (1999a) Expression of two gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor genes in various tissues of the Japanese eel and evolution of GnRH. *Zool Sci* 16:471-478.
- Okubo K, Suetake H, Aida K (1999b) A splicing variant for the prepro-mammalian gonadotropin-releasing hormone (prepro-mGnRH) mRNA is present in the brain and various peripheral tissues of the Japanese eel. *Zool Sci* 16:645-651.
- Okubo K, Suetake H, Usami T, Aida K (2000) Molecular cloning and tissue-specific expression of a gonadotropin-releasing hormone receptor in the Japanese eel. *Gen Comp Endocrinol* 119:181-192.

- Okubo K, Nagata S, Ko R, Kataoka H, Yoshiura Y, Mitani H, Kondo M, Naruse K, Shima A, Aida K (2001) Identification and characterization of two distinct gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes in a teleost, the medaka *Oryzias latipes*. *Endocrinology* 142:4729-4739.
- Okubo K, Suetake H, Aida K (2002) Three mRNA species for mammalian-type gonadotropin-releasing hormone in the brain of the eel *Anguilla japonica*. *Mol Cell Endocrinol* 192:17-25.
- Okubo K, Ishii S, Ishida J, Mitani H, Naruse K, Kondo M, Shima A, Tanaka M, Asakawa S, Shimizu N, Aida K (2003) A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314:121-131.
- Olivereau M, Chambolle P (1978) Ultrastructure of gonadotropic cells of the normal eel and after estradiol injection. *CR Acad Sci* 287:1409-1412.
- Olivereau M, Olivereau J (1979a) Effect of estradiol-17 beta on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. *Cell Tissue Res* 199:431-454.
- Olivereau M, Olivereau J (1979b) Estradiol-positive feedback on gonadotropic (GTH) cells in freshwater male silver eels. *Gen Comp Endocrinol* 39:247-261.
- O'Neill DF, Powell JF, Standen EM, Youson JH, Warby CM, Sherwood NM (1998) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonytongue fishes: putative origin of salmon GnRH. *Gen Comp Endocrinol* 112:415-425.
- Oppen-Berntsen DO, Olsen SO, Rong CJ, Taranger GL, Swanson P, Walther BT (1994) Plasma levels of eggshell Zr-proteins, estradiol-17 β , and gonadotropins during an annual reproductive cycle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Zool* 268:59-70.
- Parhar IS, Soga T, Sakuma Y (1996) In situ hybridization for two differentially expressed GnRH genes following estrogen and triiodothyronine treatment in the brains of juvenile tilapia (cichlid). *Neurosci Lett* 218:135-138.
- Parhar IS, Soga T, Sakuma Y (2000) Thyroid hormone and estrogen regulate brain region-specific messenger ribonucleic acids encoding three gonadotropin-releasing hormone genes in sexually immature male fish, *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology* 141:1618-1626.
- Parhar IS, Tosaki H, Sakuma Y, Kobayashi M (2001) Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. *Neuroscience* 104:1099-1110.
- Pasmanik M, Callard GV (1985) Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 60:244-251.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O (2005) Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 142:60-66.
- Peter RE, Prasada Rao PD, Baby SM, Illing N, Millar RP (2003) Differential brain distribution of gonadotropin-releasing hormone receptors in the goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 132:399-408.
- Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gérard E (1997) Investigation into the possible role of androgens in the induction of hepatic vitellogenesis in the European eel: *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiol Biochem* 16:107-118.
- Pinto PIS, Passos AL, Martins RS, Power DM, Canario AVM (2006) Characterization of estrogen receptor β b in sea bream (*Sparus auratus*): phylogeny, ligand-binding and comparative analysis of expression. *Gen Comp Endocrinol* 145:197-207.
- Prat F, Sumpter JP, Tyler CR (1996) Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54:1375-1382.
- Quérat B, Jutisz M, Fontaine YA, Counis R (1990a) Cloning and sequence analysis of the cDNA for the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit of the European eel. *Mol Cell Endocrinol* 71:253-259.
- Quérat B, Moumni M, Jutisz M, Fontaine YA, Counis R (1990b) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative beta subunit of the type-II gonadotropin from the European eel. *J Mol Endocrinol* 4:257-264.
- Quérat B, Hardy A, Fontaine YA (1991) Regulation of the type-II gonadotropin α and β subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *J Mol Endocrinol* 7:81-86.
- Rahman MA, Ohta K, Yamaguchi A, Chuda H, Hirai T, Matsuyama M (2003) Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. *Fish Physiol Biochem* 28:81-83.
- Rastogi RK, Di Fiore MM, D'Aniello A, Iela L, Fiorentino M (2002) GnRH in the invertebrates: an overview. *Prog Brain Res* 141:19-29.

- Rocha A, Gomez A, Zanuy S, Cerda-Reverter JM, Carrillo M (2007) Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. *Mol Cell Endocrinol* 272:63-76.
- Rosenblum PM, Goos HJTh, Peter RE (1994) Regional distribution and *in vitro* secretion of salmon and chicken II gonadotropin-releasing hormone from the brain and pituitary of juvenile and adult goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 73:21-27.
- Saito K, Lokman PM, Young G, Ozaki Y, Matsubara H, Okumura H, Kazeto Y, Yoshiura Y, Aida K, Adachi S, Yamauchi K (2003a) Follicle-stimulating hormone β , luteinizing hormone β , and glycoprotein hormone α subunit mRNA levels in artificially maturing Japanese eel *Anguilla japonica* and naturally maturing New Zealand long-finned eel *Anguilla dieffenbachii*. *Fish Sci* 69:146-153.
- Saito K, Chida Y, Adachi S, Yamauchi K (2003b) In vitro induction of luteinizing hormone synthesis by estrogen in organ-cultured pituitary glands of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zoolog Sci* 20:69-73.
- Sato N, Kawazoe I, Suzuki Y, Aida K (1996) Use of an emulsion prepared with lipophilized gelatine for the induction of ovarian maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 62:806-814.
- Sbaihi M, Fouchereau-Peron M, Meunier F, Elie P, Mayer I, Burzawa-Gérard E, Vidal B, Dufour S (2001) Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the European eel. *J Fish Biol* 59:302-318.
- Schmitz M, Aroua S, Vidal B, Le Belle N, Elie P, Dufour S (2005) Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81:107-119.
- Schreibman MP, Margolis-Nunno H, Halpern-Sebold L, Goos HJT, Perlman PW (1986) The influence of androgen administration on the structure and function of brain-pituitary-gonad axis of sexually immature platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cell Tissue Res* 245:519-524.
- Schulz RW, Bosma PT, Zandbergen MA, Van Der Sanden MCA, Van Dijk W, Peute J, Bogerd J, Goos HJTh (1993) Two gonadotropin releasing hormones in the African catfish *Clarias gariepinus*: localization, pituitary receptor binding and gonadotropin release activity. *Endocrinology* 133:1569-1577.
- Slater CH, Schreck CB, Swanson P (1994) Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol* 109A:167-175.
- So WK, Kwok HF, Ge W (2005) Zebrafish gonadotropins and their receptors: II Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits-their spatial temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol Reprod* 72:1382-1396.
- Soga T, Ogawa S, Millar RP, Sakuma Y, Parhar IS (2005) Localization of the three GnRH types and GnRH receptors in the brain of a cichlid fish: insights into their neuroendocrine and neuromodulator functions. *J Comp Neurol* 487:28-41.
- Sohn YC, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K (1998) Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunits in the goldfish *Carassius auratus*. *Fish Sci* 64:715-721.
- Sohn YC, Kobayashi M, Aida K (2001) Regulation of gonadotropin β subunit gene expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol* 129B:419-426.
- Somoza GM, Lescheid DW, Miranda LA, Lo Nostro FL, Magliulo-Cepriano L, Montaner AD, Schreibman MP, Rivier JE, Sherwood NM (2002) Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three orders of fish. *Biol Reprod* 67:1864-1871.
- Sorensen PW, Winn HE (1984) The induction of maturation and ovulation in American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur), and the relevance of chemical and visual cues to male spawning behaviour. *J Fish Biol* 25:261-268.
- Suetake H, Okubo K, Sato N, Yoshiura Y, Suzuki Y, Aida K (2002) Differential expression of two gonadotropin (GTH) β subunit genes during ovarian maturation induced by repeated injection of salmon GTH in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 68:290-298.
- Suzuki K, Kanamori A, Kawauchi H, Nagahama Y (1988) Development of salmon GTH I and GTH II radioimmunoassays. *Gen Comp Endocrinol* 71:459-467.
- Swanson P (1991) Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds), *Reproductive Physiology of Fish*. FishSymp, Sheffield, pp 2-7.
- Swanson P, Bernard M, Nozaki M, Suzuki H, Kawauchi H, Dickhoff WW (1989) Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol Biochem* 7:169-176.

- Tensen C, Okuzawa K, Blumenrohr M, Rebers F, Leurs R, Bogerd J, Schulz R, Goos H (1997) Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. *Eur J Biochem* 243:134-140.
- Todd PR (1979) Hormone-induced maturation of New Zealand freshwater eels. *Rapport et Procès-verbaux Réunions. Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 174:91-97.
- Trinh KY, Wang NC, Hew CL, Crim LW (1986) Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. *Eur J Biochem* 159:619-624.
- Tsai PS (2006) Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen Comp Endocrinol* 148:48-53.
- Twan WH, Hwang JS, Lee YH, Jeng SR, Yueh WS, Tung YH, Wu HF, Dufour S, Chang CF (2006) The presence and ancestral role of gonadotropin-releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinology* 147:397-406.
- Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland MCH, Sbaihi M, Vernier P, Zohar Y, Dufour S (2004) Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71:1491-1500.
- Vischer HF, Bogerd J (2003) Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 68:262-271.
- Vischer HF, Grannem JCM, Linskens MHK, Schulz RW, Bogerd J (2003) Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J Mol Endocrinol* 31:133-140.
- Weil C, Bougoussa-Houadec M, Gallais C, Itoh S, Sekine S, Valotaire Y (1995) Preliminary evidence suggesting variations of GtH1 and GtH2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 100:327-333.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol* 137 A:447-477.
- Weltzien FA, Pasqualini C, Sébert ME, Vidal B, Le Belle N, Kah O, Vernier P, Dufour S (2006) Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147:2964-2973.
- Xiong F, Liu D, Le Dréan Y, Elsholtz HP, Hew CL (1994) Differential recruitment of steroid response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II β subunit gene during salmon reproduction. *Mol Endocrinol* 8:782-793.
- Yamauchi K, Nakamura M, Takahashi H, Takano K (1976) Cultivation of larvae of Japanese eel. *Nature* 263:412.
- Yan L, Swanson P, Dickhoff WW (1992) A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol Reprod* 47:418-427.
- Yoshiura Y, Kobayashi M, Kato Y, Aida K (1997) Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin beta subunits (GTH-I β and -II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 105:379-389.
- Yoshiura Y, Suetake H, Aida K (1999) Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 114:121-131.
- Yumoto S, Suetake H, Suzuki Y, Nakamura O, Watanabe T (2001) Expression of GnRH and GnRH receptor genes in fugu *Takifugu rubripes*. *Proc Jpn Soc Comp Endocrinol* 16:20.

GnRH form	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mammalian	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Chicken II	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂
Salmon	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
Catfish	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH ₂
Seabream	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Herring	p-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Pejerrey	p-Glu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂
Whitefish	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Met	Asn	Pro	Gly-NH ₂

Figure legends

Table 1 Amino-acid sequence of the 9 GnRH variants identified in fish. C-II=chicken-II form; s=salmon form; m=mammalian form; hr=herring form; cf=catfish form; sb=sea bream form; pj=pejerrey form; wf=whitefish form.

Figure 1 Phylogeny of the different forms of GnRH present in teleosts. The double-arrow represents the hypothesis from some authors (O'Neill et al. 1998) that Elopomorpha are more ancient than Osteoglossomorpha. C-II=chicken-II form; s=salmon form; m=mammalian form; hr=herring form; cf=catfish form; sb=sea bream form; pj=pejerrey form; wf=whitefish form.

Figure 2 Distribution of the two different forms of GnRH present in the European eel (after immunocytochemical studies from Montero et al. 1994). mGnRH= mammalian form of GnRH; cGnRH-II=chicken II form of GnRH.

Figure 3 Schematic representation of sex steroid feedbacks on the GnRH-gonadotropin axis in the European eel, deduced from *in vivo* experiments. mGnRH= mammalian form of GnRH; cGnRH-II=chicken II form of GnRH; FSH=follicle-stimulating hormone; LH=luteinizing hormone; E2=estradiol; T=testosterone.

Figure 1

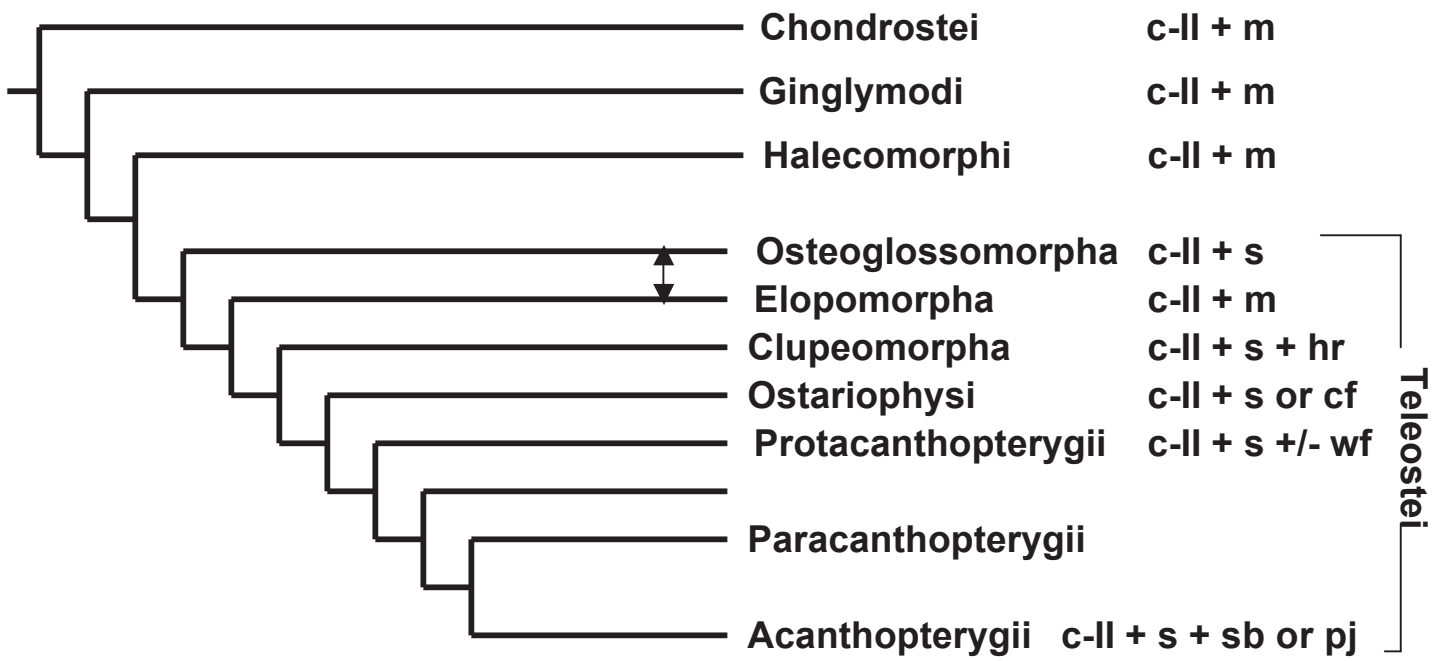


Figure 2

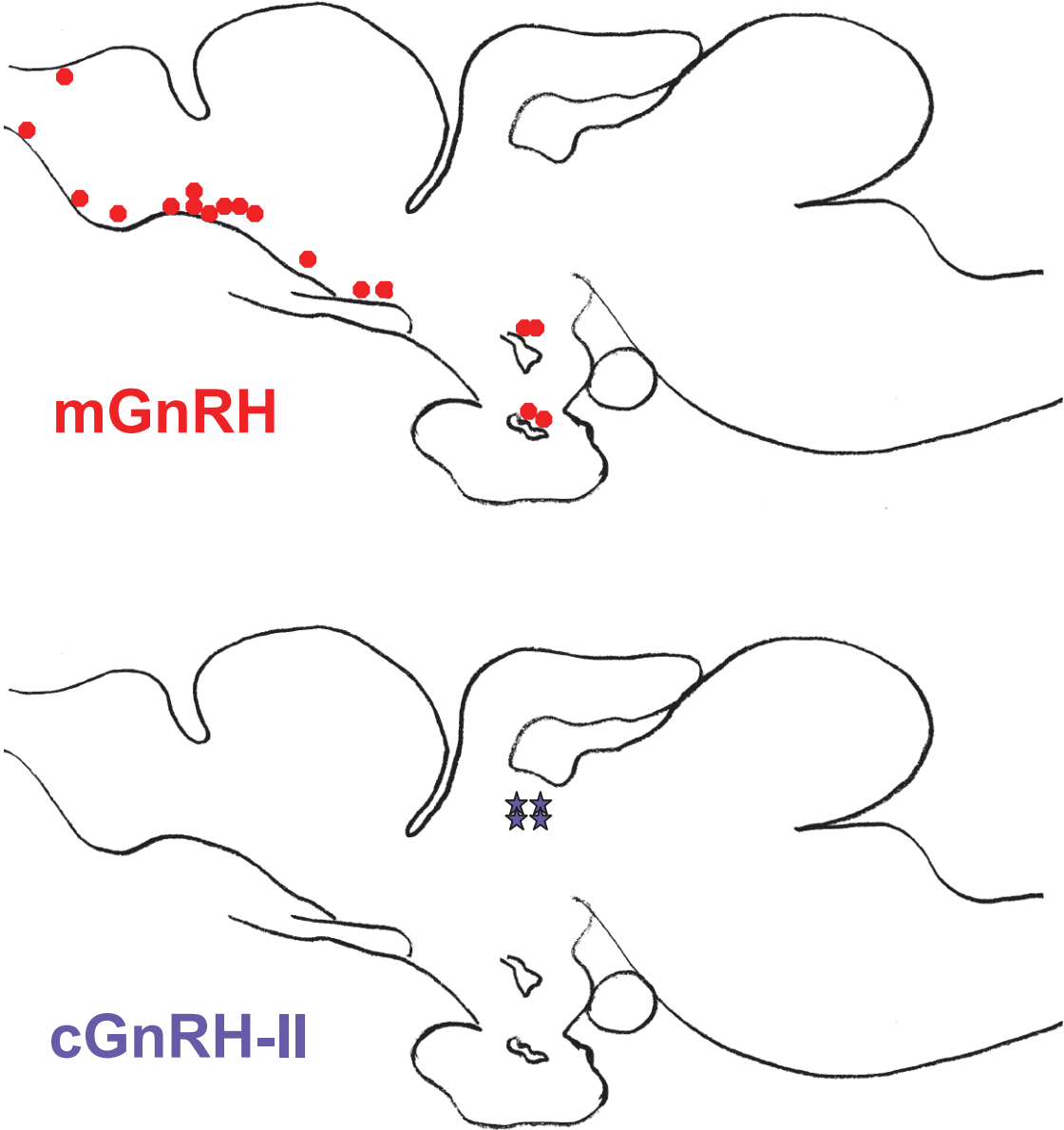
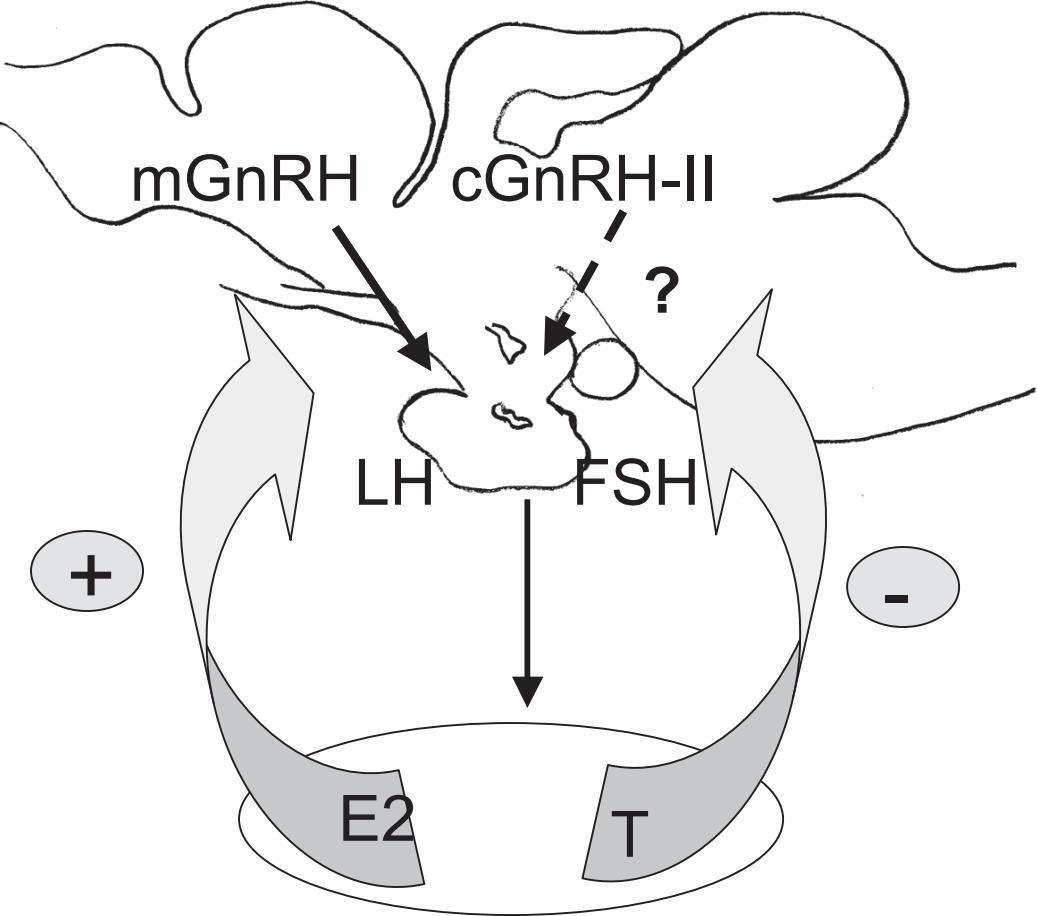


Figure 3



4. Rôle de l'activine dans la régulation différentielle des gonadotropines

Les peptides gonadiques, activine, inhibine et follistatine, connus chez les mammifères pour leurs rôles dans la modulation de la synthèse et de la sécrétion de FSH, sont des facteurs encore peu étudiés chez les espèces non-mammaliennes. Chez les téléostéens, la majorité des travaux s'intéressant à leurs fonctions dans le contrôle des gonadotropines ont été réalisés chez une seule espèce, le poisson rouge.

Nos travaux, les premiers s'intéressant au rôle de l'activine dans le contrôle des gonadotropines chez un téléostéen d'origine ancienne, mettent en évidence une activité positive directe hypophysaire de cette hormone. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le poisson rouge, chez qui il a été montré une augmentation des taux en ARNm codant pour la sous-unité FSH β dans des cellules hypophysaire en culture après des traitements par de l'activine B recombinante de poisson rouge (Yam et al, 1999). Un rôle positif de l'activine a également été démontré chez les mammifères (pour revue : Knight, 1996 ; Phillips, 2005). Ces résultats permettent de suggérer que la fonction stimulatrice de l'activine dans le contrôle de la FSH est une fonction ancienne qui s'est maintenue au cours de l'évolution; néanmoins, des études complémentaires chez d'autres espèces de vertébrés sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En plus de cet effet positif de l'activine sur la FSH, nos résultats ont mis en évidence une action directe hypophysaire inhibitrice de l'activine B sur l'expression de la sous-unité LH β . Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules hypophysaires de poisson rouge en culture traitées par de l'activine B recombinante de poisson rouge ou par de l'activine A recombinante humaine (Yam et al, 1999 ; Yuen et Ge, 2004). A l'inverse de ce qui est observé chez ces deux téléostéens, chez les mammifères, l'activine ne semble pas avoir d'effet direct hypophysaire sur le contrôle de la LH (pour revue: Peng et Mukai, 2000).

Contrairement au contrôle stimulateur de l'activine sur la FSH qui semble être une fonction conservée au cours de l'évolution, les effets directs négatifs exercés sur la LH apparaissent plus spécifiques aux téléostéens même si des études comparatives chez d'autres espèces sont encore nécessaires pour éclairer ce point.

Chez l'anguille, l'activine est donc capable d'intervenir dans la régulation différentielle de l'expression des gonadotropines, en stimulant l'expression de FSH β et en inhibant celle de LH β . L'activine, qui est le premier facteur chez l'anguille capable de stimuler fortement

l'expression de la FSH β *in vitro*, pourrait donc être impliquée dans l'activation de l'axe gonadotrope se produisant à l'initiation de la puberté au cours du processus d'argenture. Pour vérifier cette hypothèse, des études complémentaires s'intéressant au suivi de l'expression et de la production de l'activine endogène au cours du cycle, et plus particulièrement au cours de la transition stade jaune - stade argenté, permettraient d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la puberté chez les téléostéens.

Chez les mammifères, des études suggèrent l'implication de l'activine dans la stimulation de FSH en début de puberté. Chez le rat mâle par exemple, une augmentation de la FSH et du récepteur à GnRH est observée tôt durant la puberté (pour revue : Winters et Moore, 2004). Or, la FSH comme le récepteur à GnRH répondent positivement à des traitements par l'activine (Dalkin et al 1999). Chez la femme, il a été montré que l'activine pouvait contribuer à l'augmentation de la FSH durant la puberté (Foster et al, 2000). Ces effets, observés alors que les concentrations de l'activine A restent inchangées, seraient en fait le résultat de variations des concentrations en follistatine, rendant plus importante la biodisponibilité de l'activine (Foster et al, 2000). Des observations similaires ont été faites chez le rat où Moore et ses collaborateurs montrent durant le développement pubertaire des variations de l'expression de la follistatine inverses de celle observées pour la FSH (Moore et al, 2003).

Chez les téléostéens, la présence de follistatine a récemment été démontrée chez le poisson rouge où la séquence complète de l'ADN complémentaire a été clonée et où une follistatine recombinante a été synthétisée (Cheng et al, 2007). Dans cette étude, les auteurs, après avoir suivi parallèlement l'expression des sous-unités des gonadotropines, de l'activine β B et de la follistatine, suggèrent également l'intervention du système activine/follistatine dans la régulation de la FSH au cours du cycle (Cheng et al, 2007). De plus, chez le poisson rouge comme chez les mammifères, l'ensemble de la « machinerie » nécessaire à l'action de l'activine (récepteurs et protéines intracellulaires Smad) est exprimé localement dans les cellules hypophysaires (poisson rouge : Lau et Ge, 2005 ; mammifères : Bilezikjian et al, 2004). Ces résultats permettent de suggérer des actions locales de manière autocrine/paracrine du système activine/follistatine dans la régulation des gonadotropines au cours du cycle.

Chez l'anguille, nos résultats montrent que, comme chez le poisson rouge ou les mammifères, la follistatine inhibe l'action de l'activine suggérant une origine évolutive ancienne du système activine/follistatine. L'étude de l'expression de l'activine nous a permis de montrer que, comme chez le poisson rouge (Yam et al, 1999) et les mammifères (pour revue : Bilezikjian et al, 2006), l'activine est exprimée dans l'hypophyse, permettant une

action locale. Le clonage et la mesure de l'expression de la follistatine nous permettraient d'étudier les variations de l'expression du couple activine/follistatine au cours de l'argentine.

Nous avons également montré l'expression de l'activine dans le cerveau permettant d'émettre l'hypothèse d'une action au niveau central de l'activine dans le contrôle de la reproduction.

5. Rôles de facteurs métaboliques dans la régulation différentielle des gonadotropines

5.1. Rôle d'un facteur de croissance : l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

L'IGF-1 est un peptide de 70 acides aminés connu pour ses rôles dans la différenciation, la croissance et la survie des cellules de différents tissus. Participant à l'axe somatotrope, l'IGF-1 est principalement synthétisé par le foie sous l'action de l'hormone de croissance (GH) hypophysaire et libéré dans la circulation pour remplir des fonctions endocrines. Il a également été montré par des études s'intéressant aux sites de production et d'action de l'hormone que l'IGF-1 et son récepteur étaient présents dans différents tissus incluant le cerveau et les gonades où l'IGF-1 peut exercer des actions autocrines/paracrines (pour revue : Daftary et Gore, 2005).

En ce qui concerne la fonction de reproduction, chez les mammifères, différents travaux ont mis en évidence une augmentation des taux plasmatiques en IGF-1 au moment de la puberté (babouin : Copeland et al, 1982 ; humain : Luna et al, 1983 ; rat : Handelsman et al, 1987 ; mouton : Roberts et al, 1990).

Ces observations ont conduit à suggérer un possible rôle de l'IGF-1 dans la coopération/synchronisation entre les axes somatotrope (contrôlant la croissance) et gonadotrope (activé à la puberté et contrôlant la reproduction) (Hiney et al, 1991). Un certain nombre d'études *in vivo* et *in vitro* réalisées chez la souris et le rat ont montré que l'IGF-1 était capable de stimuler la synthèse et la libération de GnRH ; en effet, les neurones à GnRH expriment des récepteurs à l'IGF-1 (Pour revue : Daftary et Gore, 2005). De plus, des travaux sur culture cellulaire ont également montré un effet direct hypophysaire de l'IGF-1 sur la sécrétion de LH et FSH (pour revue : Lackey et al, 1999).

L'implication de l'IGF-1 dans le contrôle de l'axe gonadotrope, particulièrement au moment de la puberté, a également été recherchée chez les téléostéens. Les premiers travaux s'intéressant à cette question ont été réalisés chez l'anguille européenne où des cellules hypophysaires en culture recevaient des traitements par de l'IGF-1. Une augmentation des contenus cellulaires et de la libération de LH ont alors été observés, démontrant que chez l'anguille, l'IGF-1 était capable de jouer un rôle direct positif dans la régulation des gonadotropines (Huang et al, 1998).

Nos travaux viennent compléter ces données et montrent que, en plus d'agir sur les contenus cellulaires et la libération de LH, l'IGF-1 est capable de stimuler l'expression des ARNm codant pour la sous-unité LH β (cf études complémentaires). Cependant, l'effet sur l'expression des ARNm n'est significatif qu'à forte dose et d'une amplitude moindre par rapport aux effets observés sur la synthèse de la protéine LH dans les études antérieures (Huang et al, 1998). Ceci suggère que l'IGF-1 pourrait avoir plusieurs actions sur la production de LH, à la fois transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

Nous avons également cherché à savoir si l'expression de la sous-unité FSH β dans les cellules hypophysaires en culture était modifiée par des traitements à l'IGF-1. Nous n'avons pas observé de variations significatives des taux d'ARNm de FSH β dans les cellules traitées à l'IGF-1 en comparaison avec les cellules témoins (cf études complémentaires). L'IGF-1 aurait ainsi un rôle différentiel au niveau hypophysaire dans le contrôle de l'expression des hormones gonadotropes chez l'anguille.

Dans une étude récente sur des cultures de cellules hypophysaires de saumon masou mâle, Furukuma et ses collaborateurs (2008) observent, comme nous chez l'anguille, une stimulation de l'expression de la sous-unité LH β sous l'effet de l'IGF-1. Cependant les auteurs montrent également une augmentation de l'expression des 2 autres sous-unités des gonadotropines, GP α et FSH β . En revanche, la même expérience réalisée chez la femelle ne montre aucune variation des taux d'ARNm codant pour les sous-unités des gonadotropines, mais une augmentation de la libération de LH et FSH est observée (Furukuma et al, 2008). Les précédentes études chez le saumon masou n'avaient pas permis de mettre en évidence des effets directs de l'IGF-1 sur la production ou la libération des gonadotropines, mais elles avaient montré que l'IGF-1 jouait un rôle dans la modulation de la réponse des cellules gonadotropes à la stimulation par GnRH (Baker et al, 2000 ; Ando et al, 2006). Des résultats similaires avaient également été obtenus par Weil et ses collaborateurs chez la truite arc-en-ciel (Weil et al, 1999).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'IGF-1 est capable de jouer un rôle dans le contrôle de l'axe gonadotrope chez les téléostéens en intervenant au niveau hypophysaire sur la régulation de l'expression des sous-unités des gonadotropines ou sur la modulation de la sensibilité des cellules à la GnRH.

Chez l'anguille, nos résultats indiquent que l'IGF-1 interviendrait majoritairement sur l'hormone LH en modulant l'expression de la LH β , la production de l'hormone LH et sa libération. Au cours du processus d'argenture (début de puberté), l'IGF-1 pourrait intervenir dans la stimulation des messagers codant pour la LH β (article 2). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer les taux plasmatiques en IGF-1 au cours du processus pubertaire. En ce qui concerne la FSH, il semblerait qu'il n'y ait pas d'action directe au niveau des messagers, mais des études complémentaires s'intéressant aux effets de l'IGF-1 sur les contenus cellulaires et sur la libération de FSH sont nécessaires, de même que des travaux sur les effets combinés de l'IGF-1 et de la GnRH sur les cellules gonadotropes. A côté de ces effets hypophysaires, il serait intéressant de rechercher l'action possible de l'IGF-1 au niveau cérébral, en particulier sur l'activité des neurones à GnRH comme cela a été montré chez les mammifères. L'ensemble de ces données permettrait de conclure quant à l'importance et aux mécanismes du rôle de l'IGF-1 dans l'activation de l'axe gonadotrope au moment de la puberté.

5.2. Rôle de la leptine

La leptine est une protéine de 167 acides aminés qui, chez les mammifères, est majoritairement produite par le tissu adipeux. Cette hormone, impliquée dans le métabolisme énergétique et le contrôle de la prise alimentaire (Friedman, 2002), intervient également dans différentes fonctions physiologiques telles que l'inflammation, l'angiogenèse, les fonctions immunitaires, l'hématopoïèse et la fonction de reproduction (Pour revue : Caprio et al, 2001 ; Chan et Mantzoros, 2001; Brann et al, 2002). Les premiers travaux sur des souris ou des humains déficients en leptine ont mis en évidence son implication dans le contrôle de l'axe reproducteur (pour revue : Caprio et al, 2001 ; Chan et Mantzoros, 2001). En effet, les souris mutées déficiente en leptine (*ob/ob*) ou n'exprimant pas son récepteur (*db/db*) sont obèses, stériles et ont des taux plasmatiques en gonadotropines bas (Swerdloff et al, 1976, 1978 ; Johnson et Sidnam, 1979 ; Batt et al, 1982). Des observations similaires ont été faites chez l'homme, chez qui une déficience en leptine entraîne un hypogonadisme

hypogonadotrope (caractères sexuels secondaires réduits, absence de puberté, déficit en FSH et LH). Ces effets peuvent être corrigés par l'administration de leptine (pour revue : Blüher et Mantzoros, 2007).

La leptine a donc été proposée comme un des facteurs métaboliques capables « d'informer » le cerveau sur l'état des réserves énergétiques de l'individu, et donc capable de déclencher ou au moins de faciliter l'entrée en puberté. Cette hypothèse a été appuyée par l'étude de sa distribution montrant que la leptine est exprimée dans différents tissus dont l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades (pour revue : Brann et al, 2002 ; Blüher et Mantzoros, 2007). De plus, un certain nombre de travaux chez les mammifères ont permis de mettre en évidence un lien entre la leptine et la puberté (pour revue : Caprio et al, 2001).

Chez les poissons, différents groupes ont travaillé sur les effets *in vitro* de la leptine (recombinante mammalienne) sur des cultures de cellules hypophysaires. Chez le bar, Peyon et ses collaborateurs (2001) avaient mis en évidence un effet direct hypophysaire de fortes doses (10^{-6} M) de leptine recombinante de souris sur la libération de LH. Cet effet positif était observé quel que soit le stade de développement des poissons, mais il était encore plus marqué sur des cellules provenant de mâles prépubères (Peyon et al, 2001). Chez la truite arc-en-ciel, les effets directs de la leptine (recombinante humaine) sur la libération de LH et de FSH ont également été recherchés sur des cultures de cellules hypophysaires de mâles et de femelles à différents stades (Weil et al, 2003). Les auteurs ont là aussi mis en évidence des effets directs de la leptine (10^{-6} M) sur la libération des gonadotropines, mais chez la truite, les cellules provenant de poissons immatures ne sont pas sensibles aux traitements. Les effets positifs sont observés sur des cellules provenant de poissons mâles et femelles en cours de gamétogenèse (Weil et al, 2003). Ces travaux s'intéressaient aux effets de la leptine sur les hormones gonadotropes et à notre connaissance, aucune étude ne s'est encore attelée à rechercher les effets possibles de la leptine sur l'expression des messagers des gonadotropines.

Chez l'anguille, de précédents travaux de notre équipe avaient mis en évidence une légère augmentation des contenus cellulaires en LH dans des cellules en culture traitées par de fortes doses de leptine (Pour revue : Dufour et al, 1999). Nous avons donc cherché à savoir si la leptine (recombinante humaine) avait un effet au niveau de l'expression des sous-unités des gonadotropines (données complémentaires). Nos résultats montrent que quelle que soit la dose utilisée, la leptine n'a pas d'effets directs sur l'expression des messagers des gonadotropines (données complémentaires).

Néanmoins, il faut tenir compte du fait que ces études sur les rôles physiologiques de la leptine chez les téléostéens ont toutes été réalisées à l'aide de leptine recombinante mammalienne.

Le clonage de la leptine chez des espèces non-mammaliennes n'a été réalisé que très récemment chez le fugu et le medaka (*Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Oryzias latipes*, Kurokawa et al, 2005), du fait de la grande divergence existant entre ces formes et les formes mammaliennes. Un ADNc codant pour la leptine a également été obtenu chez la carpe, *Cyprinus carpio* (Huisin et al, 2006) et son existence démontrée par comparaison de séquences chez le saumon atlantique (*Salmo salar*), la salamandre (*Ambystoma tigrinum*) et le xénope (*Xenopus tropicalis*) (Kurokawa et al, 2005). Le faible pourcentage d'identité entre les séquences de leptine mammaliennes et celle provenant de vertébrés non-mammaliens (Kurokawa et al, 2005) montrait la nécessité d'obtenir des formes recombinantes de poissons. La première a été obtenue cette année par Yacobovitz et ses collaborateurs (2008) chez le fugu.

Les premières données obtenues chez les téléostéens indiquent que la leptine est capable de jouer un rôle dans le contrôle de l'axe gonadotrope. Nos résultats indiquent que les actions de la leptine ne semblent pas s'exercer directement sur l'expression des gonadotropines. Néanmoins, elle semble jouer un rôle dans la production et la libération des gonadotropines (Dufour et al, 1999 ; Peyon et al, 2000 ; Weil et al, 2003). Celui-ci pourrait s'exercer par la sensibilisation des cellules gonadotropes à d'autres facteurs comme, par exemple la GnRH (Weil et al, 2003). La leptine pourrait également exercer son action au niveau cérébral via les neurones à GnRH ou le système kiss-1/GPR54. En effet, des études chez les mammifères montrent que les neurones à GnRH expriment le récepteur à la leptine (Zamorano et al, 1997 ; Lebrethon et al, 2000), et des traitements par la leptine sont capables de stimuler l'expression de kiss-1 dans l'hypothalamus de souris mutées *ob/ob* (déficiente en leptine) (Smith et al, 2006 ; Luque et al, 2007).

5.3. Rôle du cortisol

Le cortisol est une hormone stéroïde sécrétée par les glandes surrénales en réponse à l'adrénocorticotropine hypophysaire (ACTH). Elle intervient majoritairement dans la mobilisation des réserves énergétiques et dans l'adaptation au stress.

Chez les mammifères, différents travaux s'intéressant aux effets du stress et des glucocorticoïdes sur la fonction de reproduction ont amené à des résultats contradictoires. Chez les mammifères, un stress ou des traitements chroniques par de l'ACTH ou des corticostéroïdes entraînent en général une inhibition de la fonction de reproduction (pour revue : Brann et Mahesh, 1991). Cependant, le cortisol peut également exercer des effets positifs sur la reproduction. Chez les mammifères, différentes expérimentations ont montré l'implication des corticostéroïdes dans le processus pubertaire. Chez le rat femelle, par exemple, l'adrénalectomie induit un retard de la puberté, un effet qui peut être corrigé par l'administration de corticostérone (Ramaley, 1976 ; Macfarland et Mann, 1977) ; inversement, l'administration de corticostéroïdes avance la puberté (Kraulis et al, 1978). De plus, il a été montré chez le rat que le cortisol et la corticostérone étaient capables de stimuler la synthèse de FSH in vivo et in vitro (Suter et Schwartz, 1985a,b ; Suter et al, 1988 ; Ringstrom et al, 1991 ; McAndrews et al, 1994).

Comme chez les mammifères, chez les poissons, le stress et les traitements par le cortisol ont en général un impact négatif sur la croissance, la réponse immunitaire et la reproduction (pour revue : Bonga, 1997). Chez la carpe, où les effets du stress et du cortisol sur la fonction de reproduction ont plus particulièrement été étudiés, Goos et ses collaborateurs montrent qu'ils ont des effets inhibiteurs importants. Chez des mâles soumis à un stress de température, le développement testiculaire est inhibé et les taux plasmatiques en stéroïdes sexuels sont bas; des résultats similaires sont obtenus chez des mâles traités au cortisol (pour revue : Goos et Consten, 2002).

Les corticostéroïdes auraient également chez les poissons des effets positifs sur la reproduction. Chez le saumon par exemple, une hyperactivation des glandes interrénales et une élévation des taux plasmatiques en cortisol ont été observées au moment de la maturation sexuelle et de la remontée des rivières pour la reproduction (Donaldson et Fagerland, 1972). De même, chez d'autres poissons migrateurs, comme l'anguille ou la lamproie, le développement gonadique se produit au cours d'une migration. Durant cette période, le

cortisol joue un rôle crucial dans la mobilisation des réserves énergétiques (pour revue : Larsen et Dufour, 1993).

L'ensemble de ces observations permettaient de suggérer un rôle indirect du cortisol dans la reproduction, mais également d'émettre l'hypothèse de possibles actions directes dans le contrôle de l'axe reproducteur. Pour tester cette hypothèse, quelques études *in vivo* ont été réalisées chez la truite juvénile et l'anguille. Les auteurs ont montré que des injections de cortisol étaient capables d'induire une augmentation des contenus hypophysaires en LH (truite : Crim et al, 1981 ; anguille : Dufour et al, 1983b).

De plus, chez l'anguille, de précédents travaux de l'équipe s'intéressant aux effets du cortisol sur les cellules hypophysaires, ont montré l'existence de régulations directes hypophysaires de l'expression, la synthèse et la libération de l'hormone LH (Huang et al, 1999). Ces effets positifs sur la production et la libération de LH sont encore plus importants lorsque les cellules reçoivent des traitements combinés cortisol et androgènes (Huang, 1998).

Pour compléter ces résultats, nous avons recherché les effets de traitements par le cortisol seul ou en combinaison avec les stéroïdes sexuels (E2, T et DHT) sur l'expression des trois sous-unités des gonadotropines de cellules hypophysaires en culture (études complémentaires). Nos résultats confirment ce qui avait été trouvé précédemment sur l'expression de la sous-unité LH β avec une stimulation de l'expression par le cortisol et un effet synergique de la combinaison cortisol - androgènes. En revanche, aucune variation de l'expression des sous-unités GP α et FSH β n'est observée suite à ces traitements (études complémentaires).

Ces données montrent que le cortisol est capable de jouer un rôle directement au niveau des cellules hypophysaires dans le contrôle différentiel des gonadotropines chez l'anguille, en exerçant des régulations sur la LH et pas sur la FSH. De plus, ces résultats montrent que les différentes hormones sont capables d'interagir dans l'exercice de leur contrôle, montrant la complexité des systèmes de régulation et la nécessité de rechercher les effets de combinaison d'hormones.

En plus de ces actions directes hypophysaires dans la régulation différentielle de l'expression des gonadotropines, le cortisol pourrait aussi intervenir via le contrôle cérébral. En effet, des travaux antérieurs de l'équipe avaient mis en évidence une augmentation des taux de mGnRH dosés par RIA chez les anguilles ayant reçu des traitements combinés cortisol – testostérone – oestradiol (Sbaihi, 2001). Le cortisol pourrait donc, en collaboration avec les stéroïdes sexuels, intervenir dans la régulation différentielle des gonadotropines en agissant directement au niveau hypophysaire ou indirectement au niveau hypothalamique.

Le cortisol pourrait intervenir dès l'initiation de la puberté, en effet, dans une récente étude, Van Ginneken et ses collaborateurs (2007) ont mis en évidence une élévation des taux plasmatiques de cortisol au cours du processus d'argenteure : le cortisol pourrait ainsi participer à la stimulation de l'expression de LH que nous avons observée en fin d'argenteure.

Le cortisol pourrait également jouer un rôle au cours de la maturation sexuelle dans l'amplification de la production de l'hormone LH en plus de ses fonctions dans la mobilisation des réserves au cours de cette période où l'anguille a une intense activité de migration (plus de 6000 km) alors qu'elle ne s'alimente plus.

V. CONCLUSIONS E P E S P E T I V E

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux profils d'expression des hormones gonadotropes au cours du cycle biologique et aux facteurs périphériques potentiellement impliqués dans leurs régulations chez l'anguille européenne.

1. Expression différentielle des hormones gonadotropes au cours du cycle

Nos résultats de suivi de l'expression des gonadotropines montrent une régulation différentielle des deux hormones au cours du cycle.

Durant l'argenture, processus souvent caractérisé de métamorphose, on observe dès les premiers stades une augmentation de l'expression de la FSH β . Cette variation d'expression hypophysaire coïncide avec l'apparition de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des ovocytes contenus dans les gonades. La stimulation de l'expression de la FSH β hypophysaire correspond également au moment où une première élévation des taux plasmatiques d'E2 est observée. L'ensemble de ces observations nous permet de suggérer une implication de l'hormone folliculo-stimulante dans ces deux « événements » gonadiques : le début de la vitellogenèse endogène et la production d'œstrogènes.

En fin d'argenture, alors que les taux hypophysaires en ARNm codant pour la FSH β tendent à diminuer, ceux codants pour la LH β augmentent de façon drastique. Ces variations s'accompagnent d'une augmentation des taux plasmatiques en stéroïdes sexuels (œstrogènes et androgènes).

L'ensemble de ces observations montrent qu'au cours du processus d'argenture, l'axe gonadotrope est activé, avec des modifications au niveau hypophysaire comme au niveau gonadique, suggérant une « initiation de la puberté ». De plus, contrairement aux résultats obtenus lors de la métamorphose des amphibiens ou du saumon (smoltification), aucune variation significative de l'expression des hormones impliquées dans les axes somatotrope et thyroïdienne n'est observée.

Cela nous a permis de redéfinir l'argenture, qui était jusque-là qualifiée de métamorphose secondaire, comme un événement pubertaire. Ceci indique que deux

« métamorphoses secondaires » rencontrées chez deux groupes de téléostéens (saumon et anguille) auraient un mécanisme de contrôle neuroendocrinien et une origine évolutive très différents.

Au cours de la maturation sexuelle induite par des traitements gonadotropes, les hormones gonadotropes sont également régulées de manière différentielle avec la poursuite des tendances observées en fin d'argentine, c'est-à-dire une baisse de l'expression de la FSH β et une forte augmentation de l'expression de la LH β . Ces régulations sont, au moins en partie, dues aux rétrocontrôles stéroïdiens. Ces rétrocontrôles pourraient intervenir très tôt au cours de l'argentine dans la stimulation de la synthèse de l'hormone LH.

2. Les facteurs périphériques candidats à l'activation de l'axe gonadotrope à la puberté

Afin d'identifier les facteurs potentiellement impliqués dans la régulation différentielle des gonadotropines au moment de l'initiation de la puberté et de la maturation sexuelle, nous avons testé les effets de différentes hormones candidates *in vivo* et surtout *in vitro* sur des cultures primaires de cellules hypophysaires. En effet, l'hypophyse est un niveau d'intégration important chez les téléostéens.

2.1. Les facteurs gonadiques

Nos résultats montrent l'existence de rétrocontrôles positifs directs au niveau hypophysaire des stéroïdes sexuels. En effet, comme il avait été montré précédemment, les androgènes sont capables de stimuler spécifiquement l'expression de la sous-unité LH β alors qu'ils n'ont pas d'effets sur l'expression de la sous-unité FSH β . Au contraire, l'E2 qui n'induit pas de variations de l'expression de la sous-unité LH β est capable de stimuler l'expression de la FSH β .

Notre étude sur les effets des stéroïdes sexuels *in vivo* montre des résultats différents ; l'expression de la sous-unité LH β est stimulée par E2 alors que les androgènes ont peu ou pas d'effets. En ce qui concerne la sous-unité FSH β , les traitements *in vivo* n'induisent que peu ou pas de variations. La divergence des effets *in vitro* et *in vivo* montre l'implication du contrôle

cérébral dans les rétrocontrôles exercés par les stéroïdes sexuels au niveau des gonadotropines.

Les rétrocontrôles exercés par les stéroïdes sexuels participent donc à la régulation différentielle des hormones gonadotropes et vont exercer leurs actions à travers différentes voies. Ils vont agir de manière directe hypophysaire en contrôlant l'expression et la synthèse des gonadotropines. Ils vont également agir de manière indirecte via le contrôle cérébral : de précédentes études avaient mis en évidence les effets positifs d'E2 sur la production de mGnRH dans la région préoptique. De plus, de récents travaux de l'équipe montrent que les androgènes sont capables d'exercer des rétrocontrôles positifs sur la production de dopamine.

Globalement, *in vivo*, les stéroïdes induisent une augmentation de l'expression et de la synthèse de LH, mais ont peu d'effets sur FSH.

Le système activine/inhibine/follistatine peu étudié chez les espèces non-mammaliennes semble pourtant exercer un rôle important dans le contrôle différentiel des hormones gonadotropes. Chez les mammifères, l'activine est un des facteurs majeurs dans le contrôle de la production de FSH.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux effets directs hypophysaires de l'activine et de « sa protéine de liaison » à effet antagoniste, la follistatine, sur l'expression des sous-unités des gonadotropines. Nos résultats démontrent que l'activine exerce des actions spécifiques et directes hypophysaires sur les sous-unités LH β et FSH β . De plus, ces actions sont opposées sur les deux sous-unités : l'activine stimule l'expression de la FSH β et inhibe celle de la LH β . Ces effets sont abolis par le traitement double activine/follistatine.

Dans ce travail, nous mettons donc en évidence, pour la première fois chez l'anguille, un facteur hautement actif dans la stimulation de la sous-unité FSH β : l'activine. Cette hormone, exprimée dans les gonades mais également dans l'hypophyse, pourrait donc être un facteur majeur intervenant précocement au cours de l'argenture pour induire le pic de FSH marquant l'initiation de la puberté.

2.2. Les facteurs métaboliques

Différentes hormones impliquées dans la croissance ou la mobilisation des réserves énergétiques sont suspectées d'avoir également un rôle dans le contrôle de l'axe gonadotrope,

plus particulièrement au moment de l'activation de l'axe en période pubertaire. Ces hormones agiraient comme des signaux indiquant que l'individu a accumulé suffisamment de réserves et est donc prêt à se reproduire et pourraient donc agir comme des éléments déclencheurs ou facilitateurs.

L'une de ces hormones, l'IGF-I, impliquée dans le contrôle de la croissance, a été testée *in vitro* sur des cultures de cellules hypophysaires. Nos résultats montrent que l'IGF-I est capable de stimuler l'expression de la sous-unité LH β . Lors d'une étude antérieure réalisée par l'équipe, il avait été observé une augmentation du contenu hypophysaire et de la libération de l'hormone LH après des traitements par l'IGF-I. L'ensemble de ces résultats démontrent que l'IGF-I est capable d'agir directement au niveau hypophysaire pour stimuler le niveau d'expression de l'hormone LH, sa production et sa libération.

Concernant la sous-unité FSH β , elle ne semble pas être régulée directement par l'IGF-I ; en effet, aucune variation de son expression n'est observée après traitement *in vitro*. Ces résultats montrent que l'IGF-I est impliquée dans la régulation différentielle des gonadotropines, agissant sur l'expression de la LH β et par sur celle de la FSH β .

Un autre facteur métabolique candidat au rôle de « signal/déclencheur » de la puberté est le cortisol. Les anguilles qui entrent dans une période d'activité intense (migration) et qui cessent de s'alimenter vont synthétiser ce facteur impliqué dans la mobilisation des réserves.

Le cortisol est capable d'agir directement au niveau des cellules hypophysaires et de stimuler l'expression de la sous-unité LH β . De plus, les traitements combinés cortisol/stéroïdes sexuels montrent que le cortisol est capable d'agir en synergie avec les androgènes pour stimuler l'expression de la sous-unité LH β . Dans une étude précédente réalisée par l'équipe, il avait été montré sur des cultures primaires de cellules hypophysaires que les traitements « cortisol » ou « cortisol et androgènes » stimulaient l'expression et également la synthèse de l'hormone LH.

En revanche, aucun effet direct hypophysaire du cortisol seul ou en combinaison avec les stéroïdes sexuels n'est observé sur l'expression de la sous-unité FSH β .

Le cortisol est donc un « acteur » potentiel dans le contrôle différentiel des hormones gonadotropes en exerçant des actions directes hypophysaires sur la sous-unité LH β et pas sur la sous-unité FSH β . Cette action pourrait intervenir au cours de l'argenteure dans l'élévation de la production de LH observée chez les anguilles argentées.

La leptine, produite par le tissu adipeux chez les mammifères et par le foie chez les téléostéens, est également une hormone candidate à la fonction de « signal/déclencheur » indiquant que l'individu est prêt pour l'activation de l'axe gonadotrope. Dans notre étude, nous n'observons aucun effet significatif direct sur l'expression des sous-unités des gonadotropines.

3. Scénario possible de l'activation de l'axe gonadotrope à l'argentine

Le processus d'argentine, qui se caractérise par d'importants changements morphologiques, physiologiques et comportementaux, est également la période au cours de laquelle l'axe gonadotrope va être activé, permettant de qualifier cette période de début de puberté. Au cours de cette initiation de la puberté, les deux hormones gonadotropes sont exprimées successivement et donc soumises à des régulations différentes.

La sous-unité FSH β est la première à connaître une stimulation de son expression. On peut émettre les hypothèses suivantes concernant le contrôle de l'expression de cette hormone :

- Si les facteurs métaboliques jouent effectivement un rôle de signal, renseignant sur l'état de croissance et de réserves énergétiques de l'organisme et permettant le déclenchement de la puberté, leurs actions ne semblent pas être exercées directement au niveau hypophysaire pour le contrôle de l'expression de la FSH. L'IGF-I comme la leptine, produites au cours de la croissance corporelle, pourraient exercer ces fonctions de signal à d'autres niveaux. Au niveau cérébral, les facteurs métaboliques pourraient, par exemple, agir sur les neurones à GnRH en stimulant la synthèse et la libération de l'hormone, ou encore ils pourraient agir en amont via le système kiss-1/GPR54.

L'IGF-1 et/ou la leptine pourraient également avoir des actions au niveau hypophysaire dans la modulation de la sensibilité des cellules gonadotropes à la GnRH (comme cela a été suggéré pour l'IGF-1 chez la truite arc-en-ciel).

L'étude de l'implication de ces facteurs métaboliques dans le contrôle cérébral est une des perspectives de ce travail. Nous avons récemment cloné partiellement les précurseurs des deux formes de GnRH (mGnRH et cGnRH-II) (Sébert et al, 2008), ce qui apporte des

outils moléculaires pour l'étude de la régulation de leur expression. Des travaux sur la caractérisation du système kiss-1/GPR54 chez l'anguille sont actuellement en cours.

- En réponse à ces modifications cérébrales et/ou hypophysaires, le système activine/follistatine serait activé : production d'activine ou down régulation de follistatine conduisant à une stimulation de l'expression de la sous-unité FSH β . Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'expression de ces deux hormones, activine et follistatine, au cours de l'argenture parallèlement aux hormones gonadotropes. Pour cela, nous avons récemment cloné partiellement la sous-unité β_B de l'activine d'anguille européenne et des amorces ont été sélectionnées. En ce qui concerne la follistatine, il faudrait également obtenir une séquence partielle de l'ADNc et sélectionner des amorces.
- La FSH agirait sur les ovaires induisant la production d'oestradiol et l'incorporation de lipides dans les ovocytes. Or, il a été montré que l'oestradiol était capable d'agir au niveau cérébral et de stimuler la production de GnRH. L'oestradiol pourrait ainsi au cours de l'argenture amplifier l'activation pubertaire des neurones à GnRH. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser des dosages de la GnRH au cours du processus d'argenture. Il serait intéressant également d'étudier si le système kiss-1/GPR54 est impliqué dans les rétrocontrôles stéroïdiens sur GnRH chez l'anguille.

Le système, maintenant « mis en marche », se poursuit et permet dans les derniers stades du processus d'argenture la stimulation de la production de LH :

- Les rétrocontrôles exercés par l'oestradiol stimuleraient l'expression, la synthèse et la libération de LH probablement via la GnRH cérébrale. De plus, à ce stade de l'argenture, l'anguille change de comportement, devenant migrante et jeûnant, deux conditions qui favorisent la production de cortisol. Une double stimulation exercée par la GnRH et le cortisol pourraient être responsable de la forte stimulation de l'hormone LH en fin d'argenture. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des traitements combinés cortisol et GnRH *in vitro* sur cultures de cellules hypophysaires.
- En réponse à la LH, les ovaires augmenteraient la production de stéroïdes sexuels (androgènes et oestrogènes) observée chez les anguilles au stade argenté.

- Les androgènes capables de stimuler spécifiquement le système dopaminergique « bloqueraient » alors la production des gonadotropines jusqu'à ce que l'individu rencontre les conditions environnementales particulières de la migration.

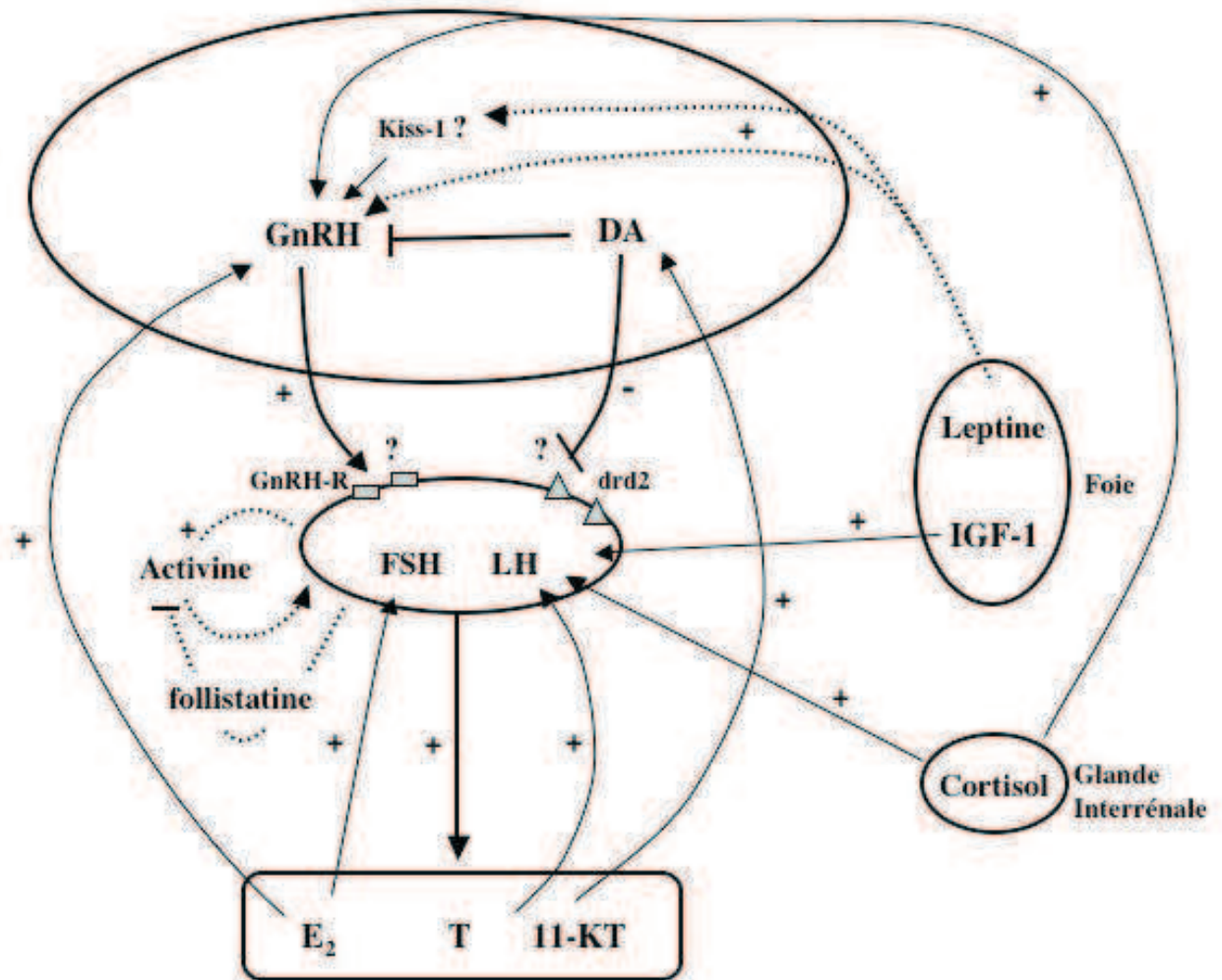


Figure 13 : Rôles établis ou potentiels de facteurs neuroendocrines dans le contrôle des gonadotropines chez l'anguille.

Au cours de la migration, une fois la levée du blocage dopaminergique (résultant probablement d'une combinaison de différents facteurs environnementaux et endogènes), la maturation sexuelle serait caractérisée par une augmentation de la production des gonadotropines et en particulier une forte élévation de LH en fin de maturation (d'après les

résultats de maturation expérimentale) qui préparerait le pic ovulatoire. Cette stimulation de la LH serait sous le contrôle double des stéroïdes sexuels et du cortisol.

L'ensemble de nos travaux ont été centrés sur l'effet des facteurs périphériques (gonadiques et métaboliques) sur le contrôle différentiel de l'expression des gonadotropines. L'étape suivante sera d'intégrer ces effets avec ceux du contrôle cérébral par les systèmes stimulateurs kiss-1 / GnRH et inhibiteur dopaminergique.

Bibliographic

A

- Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B, Rosenfeld H, 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 142, 212-221.
- Alexander G, Sweeting R, McKeown B, 1994. The shift in visual pigment dominance in the retinae of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): an indicator of smolt status. *J Exp Biol* 195, 185-197.
- Alexander G, Sweeting R, McKeown B, 1998. The effect of thyroid hormone and thyroid hormone blocker on visual pigment shifting in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 168, 157-168.
- Alexander JM, Swearingen B, Tindall GT, Klibanski A, 1995. Human pituitary adenomas express endogenous inhibin subunit and follistatin messenger ribonucleic acids. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 147-152.
- Allen BM, 1916. Extirpation experiments in *Rana pipiens* larva. *Science* 44, 755-757.
- Alok D, Hassin S, Sampath KR, Trant JM, Yu K, Zohar Y, 2000. Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: functional expression in a fish cell line. *Mol Cell Endocrinol* 168, 65-75.
- Amano M, Aida K, Okumoto N, Hasegawa Y, 1992. Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in the female Masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. *Zool Sci* 9, 375-386.
- Amano M, Hyodo S, Urano A, Okumoto N, Kitamura S, Ikuta K, Suzuki Y, Aida K, 1994. Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17 α -methyltestosterone administration in female masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 95, 374-380.
- Amos MR, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R, 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem and Biophys Res Commun* 44, 205-210.
- Ando H, Ishii S, 1994. Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acids for the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit and luteinizing hormone beta-subunit precursor molecules of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 93, 357-368.
- Ando H, Sasaki Y, Okada H, Urano A, 2001. Prepubertal increases in the levels of two salmon gonadotropin-releasing hormone mRNAs in the ventral telencephalon and preoptic area of masu salmon. *Neurosci Lett* 307, 93-96.
- Ando H, Swanson P, Kitani T, Koide N, Okada H, Ueda H, Urano A, 2004. Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17 β on gonadotropin subunit gene expression and release in masu salmon pituitary cells in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 137, 109-121.
- Ando H, Luo Q, Koide N, Okada H, Urano A, 2006. Effects of insulin-like growth factor I on GnRH-induced gonadotropin subunit gene expressions in masu salmon pituitary cells at different stages of sexual maturation. *Gen Comp Endocrinol* 149, 21-29.
- Anglade I, Zandbergen T, Kah O, 1993. Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273, 345-355.
- Arai T, Otake T, Tsukamoto K, 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Mar Biol* 137, 39-45.
- Archer S, Hope A, Partridge JC, 1995. The molecular basis for the green-blue sensitivity shift in the rod visual pigments of the European eel. *Proc Biol Sci* 262, 289-295.

Asashima M, Nakano H, Uchiyama H, Sugino H, Nakamura T, Eto Y, Ejima D, Davids M, Plessow S, Cichocka I, Kinoshita K, 1991. Follistatin inhibits the mesoderm-inducing activity of activin-A and the vegetalizing factor from chicken embryo. *Roux's Arch Dev Biol* 200, 4-7.

Attardi B, Miklos J, 1990. Rapid stimulatory effect of activin-A on messenger RNA encoding the follicle-stimulating hormone beta-subunit in rat pituitary cell cultures. *Mol Endocrinol* 4, 721-726.

Attardi B, Winters SJ, 1993. Decay of follicle-stimulating hormone- β messenger RNA in the presence of transcriptional inhibitors and/or inhibin, activin, or follistatin. *Mol Endocrinol* 7, 668-680.

Attisano L, Wrana JL, 1998. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 188-94.

B

Baggerman B, 1963. The effect of TSH and anti-thyroid substances on salinity preference and thyroid activity in juvenile Pacific salmon. *Can J Zool* 41, 307-319.

Bailey JS, Rave-Harel N, McGillivray SM, Coss D, Mellon PL, 2004. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene involves Smads and the TALE homeodomain proteins Pbx1 and Prep1. *Mol Endocrinol* 18, 1158-1170.

Baker BI, Ingleton PM, 1975. Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries *in vitro*. II. Effect of salt concentration during long-term organs culture. *J Comp Physiol* 100, 269-282.

Baker DM, Davies B, Dickhoff WW, Swanson P, 2000. Insulin-like growth factor I increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH release from coho salmon pituitary cells *in vitro*. *Biol Reprod* 63, 865-871.

Baratta M, West LA, Turzillo AM, Nett TM, 2001. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 64, 714-719.

Barbin GP, 1998. The role of olfaction in homing and estuarine migratory behavior of yellow-phase American eels. *Can J Fish Aquat Sci* 55, 564-575.

Bardet PL, Horard B, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Vanacker JM, 2002. Characterization of estrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol* 28, 153-163.

Barni S, Bernocchi G, Gerzeli G, 1985. Morphohistochemical changes in hepatocytes during the life cycle of the European eel. *Tissue Cell* 17, 97-109.

Barron MG, 1986. Endocrine control of smoltification in anadromous salmonids. *J Endocrinol* 108, 313-319.

Batt RA, Everard DM, Gillies G, Wilkinson M, Wilson CA, Yeo TA, 1982. Investigation into the hypogonadism of the obese mouse (genotype ob/ob). *J Reprod Fertil* 64, 363-371.

Bauer H, Meier A, Hild M, Stachel S, Economides A, Hazelett D, Harland RM, Hammerschmidt M, 1998. Follistatin and noggin are excluded from the zebrafish organizer. *Dev Biol* 204, 488-507.

Beatty DD, 1975. Visual pigments in the American eel *Anguilla rostrata*. *Vision Res* 15, 771-776.

Bertin L, 1951. Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvenile et sexualité, migrations, métamorphoses. Paris, Payot.

Bertin L, 1958. Larves et métamorphoses. In "Traité de Zoologie" (eds Grassé P), Paris, Masson, XIII, 3, pp 1813-1834.

Besecke LM, Guendner MJ, Sluss PA, Polak AG, Woodruff TK, Jameson JL, Bauer-Dantoin AC, Weiss J, 1997.

- Pituitary follistatin regulates activin-mediated production of follicle-stimulating hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 138, 2841-2848.
- Beullens K, Eding EH, Gilson P, Ollevier F, Komen J, Richter CJJ, 1997. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153, 135-150.
- Bilezikjian LM, Vaughan JM, Vale WW, 1993. Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133, 2545-2553.
- Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW, 2004. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol Cell Endocrinol* 225, 29-36.
- Bilezikjian L, Blount A, Donaldson C, Vale W, 2006. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. *Reproduction* 132, 207-215.
- Billard R, Richard M, Breton B, 1977. Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 33, 163-165.
- Björnsson BT, 1997. The biology of salmon growth hormone : from daylight to dominance. *Fish Physiol Biochem* 17, 9-24.
- Blüher S, Mantzoros CS, 2007. Leptin in reproduction. *Curr Opin in Endocrinol Diabetes Obes* 14, 458-464.
- Boëtius I, Larsen LO, 1991. Effects of testosterone on eye size and spermiation in silver eels, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol* 82, 238.
- Boeuf G, 1993. Salmonid smolting : a pre-adaptation to the oceanic environment. In "Fish Ecophysiology" (eds Rankin JC and Jensen FB), pp 105-135.
- Boeuf G, Prunet P, 1985. Measurements of gill (Na⁺ - K⁺)-ATPase activity and plasma thyroid hormones during smoltification in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 45 (1-4), 111-119.
- Boeuf G, Le Bail PY, 1990. Growth hormone and thyroid hormones levels during smolting in different populations of Atlantic salmon. In "Progress in Clinical Research" (eds Epplé A, Scanes CG and Steson MH) New York, Wiley-Liss Inc, 342, pp 193-197.
- Bogerd J, Li KW, Janssen-Dommerholt C, Goos H, 1992. Two gonadotropin-releasing hormones fom African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem Biophys Res Commun* 187, 127-134.
- Bogerd J, Blomenröhr M, Andersson E, van der Putten HH, Tensen CP, Vischer HF, Granneman JC, Janssen-Dommerholt C, Goos HJ, Schulz RW, 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 64, 1633-1643.
- Bogerd J, Diepenbroek WB, Hund E, van Oosterhout F, Teves AC, Leurs R, Blomenrohr M, 2002. Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. *Endocrinology* 143, 4673-4682.
- Bogerd J, Granneman JCM, Schulz RW, Vischer HF, 2005. Fish FSH receptors bind LH: how to make the human FSH receptor to be more fishy? *Gen Comp Endocrinol* 142, 34-43.
- Bonga SEW, 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77, 591-626.
- Borg B, 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol Part C: Comp Pharmacol Toxicol* 109, 219-245.
- Borg B, Antonopoulou E, Mayer I, Andersson E, Berglund I, Swanson P, 1998. Effects of gonadectomy and

- androgen treatments on pituitary and plasma levels of gonadotropins in mature male atlantic salmon, *Salmo salar*, parr – positive feedback control of both gonadotropins. *Biol Reprod* 58, 814-820.
- Boström SL, Johansson RG, 1972. Enzyme activity patterns in white and red muscle of the eel (*Anguilla anguilla*) at different developmental stages. *Comp Biochem Physiol* 42B, 533-542.
- Bradley EA, 2001. Graves ophthalmopathy. *Curr Opin Ophthalmol* 12, 347-351.
- Braekevelt CR, 1985. Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. IV. Photoreceptors of the yellow eel stage. *Anat Anz* 158, 23-32.
- Braekevelt CR, 1988a. Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. VI. Photoreceptors of the sexually immature silver eel stage. *Anat Anz* 166:23-31.
- Braekevelt CR, 1988b. Retinal fine structure in the European eel *Anguilla anguilla*. VIII. Photoreceptors of the sexually mature silver eel stage. *Anat Anz* 167, 1-10.
- Braden TD, Conn PM, 1992. Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 130, 2101-2105.
- Brann DW, Mahesh VB, 1991. Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB J* 5, 2691-2698.
- Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD, 2002. Leptin and reproduction. *Steroids* 67, 95-104.
- Breton B, 1968. Contribution à l'étude de l'isolement et du dosage des gonadotropines de poissons. Thèse de IIIe cycle, Lyon.
- Breton B, Le Gac F, Sambroni E, 1986. Gonadotropin hormone (GtH) receptors in the ovary of the brown trout *Salmo trutta* L. *in vitro* studies. *Gen Comp Endocrinol* 64, 163-171.
- Breton B, Motin A, Billard R, Kah O, Geoffre S, Percigoux G, 1986. Immunoreactive gonadotropin releasing hormone like material in the brain and pituitary gland during the periovulatory period in the brown trout (*Salmo trutta* L.): relationships with the plasma and pituitary gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 61, 109-119.
- Breton B, Mikolajczyk T, Poppek W, Bieniarz K, Epler P, 1991. Neuropeptide Y stimulates *in vivo* gonadotropin secretion in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 84, 277-283.
- Breton B, Sambroni E, 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 101, 155-164.
- Breton B, Sambroni E, Govoroun M, Weil C, 1997. Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *C R Acad Sci Paris* 320, 783-789.
- Burger LL, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Marshall JC, 2004. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J Mol Endocrinol* 33, 559-584.
- Burzawa-Gerard E, 1971. Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, la carpe (*Cyprinus carpio* L.). *Biochimie* 53, 545-552.
- Burzawa-Gerard E, 1974. Séparation et réassociation des sous-unités de l'hormone gonadotrope d'un poisson téléostéen, la carpe (*Cyprinus carpio* L.). *C R Acad* 279D, 1681-1684.
- Burzawa-Gerard E, Dufour S, Fontaine YA, 1980. Relations immunologiques entre les hormones glycoprotéiques hypophysaires de quelques poissons et de mammifères. *Gen Comp Endocrinol* 41, 199-211.

Burzawa-Gerard E, Dumas-Vidal A, 1991. Effects of 17 β -estradiol and carp gonadotropin on vitellogenesis in normal and hypophysectomized European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. Gen Comp Endocrinol 84, 264-276.

Burzawa-Gerard E, Baloche S, Leloup-Hatey J, Le Menn F, Messaouri H, Nunez-Rodriguez J, Peyon P, Roger C, 1994. Ovogenèse chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.): ultrastructure de l'ovaire à différents stades de développement et implication des lipoprotéines au cours de la vitellogenèse. Bull Fr Pêche Piscic 335, 213-233.

C

Caldani M, Caraty A, 1997. Les neurones à GnRH: origine et localisation. In "Les Gonadotropines" (eds Combarrous Y, Volland-Nail P) Paris, INRA Editions, pp 127-141.

Callamand O, Fontaine M, 1942. L'activité thyroïdienne de l'anguille au cours de son développement. Arch Zool Exp Gen 82, 129-136.

Callard GV, Petro Z, Ryan KJ, 1978. Phylogenic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. Endocrinology 103, 2283-2290.

Callard GV, Petro Z, Ryan KJ, 1981. Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). Gen Comp endocrinol 43, 243-255.

Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P, D'Agata R, 1998. Activin-A stimulates gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and follistatin. J Endocrinol 156, 269-274.

Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW, 1994. Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. Endocrinology 134, 799-808.

Caprio M, Fabbri E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A, 2001. Leptin in reproduction. Trends Endocrinol Metab 12, 65-72.

Carlisle DB, Denton EJ, 1959. On the metamorphosis of the visual pigments of *Anguilla anguilla* (L.). Journal of the marine Biological Association of the United Kingdom 38, 97-102.

Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale W, Chin WW, 1989. Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. Mol Endocrinol 3, 1969-1976.

Carroll RS, Kowash PM, Lofgren JA, Schwall RH, Chin WW, 1991a. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. Endocrinology 129, 3299-3304.

Carroll RS, Corrigan AZ, Vale W, Chin WW, 1991b. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 129, 1721-1726.

Castonguay M, Dutil JD, Audet C, Miller R, 1990. Locomotor activity and concentration of thyroid hormones in migratory and sedentary juvenile American eels. Am Fish Soc 119:946-956.

Chan JL, Mantzoros CS, 2001. Leptin and the hypothalamic-pituitary regulation of the gonadotropin-gonadal axis. Pituitary 4, 87-92.

Chang JP, Peter RE, 1983. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. Neuroendocrinology 36, 351-357.

Chang JP, Peter RE, Nahorniak CS, Sokolowska M, 1984. Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. Gen Comp Endocrinol 55, 351-360.

- Chang JP, Yu KL, Wong AO, Peter RE, 1990. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinology* 51, 664-674.
- Cheng GFY, Yuen CW, Ge W, 2007. Evidence for the existence of a local activin-follistatin negative feedback loop in the goldfish pituitary and its regulation by activin and gonadal steroids. *J Endocrinol* 195, 373-384.
- Childs GV, Hazum E, Amsterdam A, Limor R, Naor Z, 1986. Cytochemical evidence for different routes of gonadotropin-releasing hormone processing by large gonadotropes and granulosa cells. *Endocrinology* 119, 1329-1338.
- Choi CY, Habibi HR, 2003. Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Mol Cell Endocrinol* 204, 169-177.
- Chua D, Eales JG, 1971. Thyroid function and dermal purines in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Can J Zool* 49, 1557-1561.
- Colombo G, Grandi G, Rossi R, 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *J Fish Biol* 24, 215-228.
- Combarrous Y, Chopineau M, Martinat N, 1997. Bases moléculaires de la spécificité des gonadotropines. In "les Gonadotropines" (eds Combarrous Y, Volland-Nail P) Paris, INRA Editions, pp 69-78.
- Combarrous Y, Galet C, Crépieux P, Chopineau M, R, Counis R, 2001. Les gonadotropines: Structures, fonction, mécanismes d'action. In « La reproduction chez les mammifères et l'homme » (eds Thibault C, Levasseur MC), Paris, INRA Editions, pp 108-121.
- Comrie MM, Cutler CP, Cramb G, 1999. Cloning and expression of guanylin from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochem Biophys Res Commun* 281, 1078-1085.
- Copeland KC, Kuehl TJ, Castracane VD, 1982. Pubertal endocrinology of the baboon: elevated somatomedin-C/insulin-like growth factor I at puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 55, 1198-1201.
- Copeland PA, Thomas P, 1989. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): Evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 74, 474-483.
- Copeland PA, Thomas P, 1993. Isolation of gonadotropin subunits and evidence for two distinct gonadotropins in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen Comp Endocrinol* 91, 115-125.
- Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH, Vale W, 1991. Evidence for an autocrine role of activin B within anterior cultures. *Endocrinology* 128, 1682-1684.
- Cottrill RA, McKinley RS, Van der Kraak G, Dutil J-D, Reid KB, McGrath KJ, 2001. Plasma non-esterified fatty acid profiles and 17 β -oestradiol levels of juvenile immature and maturing adult American eels in the St Lawrence River. *J Fish Biol* 59, 364-379.
- Coughlin DJ, Forry JA, McGlinchey SM, Mitchell J, Saporetti KA, Stauffer KA, 2001. Thyroxine induces transitions in red muscle kinetics and steady swimming kinematics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool* 290, 115-124.
- Counis R, 1990. Les gènes des hormones gonadotropes hypophysaires et leurs régulations. *Ann Endocrinol* 51, 72-81.
- Counis R, Dufour S, Ribot G, Quérat B, Fontaine YA, Jutisz M, 1987. Estradiol has inverse effects on pituitary glycoprotein hormone α -subunit messenger ribonucleic acid in the immature European eel and the gonadectomized rat. *Endocrinology* 121, 1178-1184.

Counis R, Jutisz M, 1991. Regulation of pituitary gonadotropin gene expression outline of intracellular signaling pathways. *Trends Endocrinol Metab* 2, 181-187.

Counis R, Combranos Y, Chabot V, Taragnat C, 2001. Régulation de la synthèse et de la libération des gonadotropines hypophysaires. In “La reproduction chez les mammifères et l’homme” (eds Thibault C, Levasseur MC), Paris, INRA Editions, pp 65-84.

Crim LW, Evans DM, 1979. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 37, 192-196.

Crim LW, Peter RE, Billard R, 1981. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen Comp Endocrinol* 44, 374-381.

Crim LW, Billard R, Genge PD, Idler DR, 1982. The influence of immature gonads on onset of gonadotropic hormone accumulation in the juvenile rainbow trout pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 48, 161-166.

Cutler CP, Sanders IL, Hazon N, Cramb G, 1995a. Primary sequence, tissue specificity and expression of Na⁺,K⁺-ATPase a1 isoform in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Comp Physiol Biochem* 111B, 567-573.

Cutler CP, Sanders IL, Hazon N, Cramb G, 1995b. Primary sequence, tissue specificity and expression of Na⁺,K⁺-ATPase b1 isoform in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Fish Physiol Biochem* 14, 423-429.

D

Dacheux F, 1978. Ultrastructural localization of gonadotrophic hormones in the porcine pituitary using the immunoperoxidase technique. *Cell Tissue Res* 191, 219-232.

Dadoune JP, Demoulin A, 2001. Structure et fonctions du testicule. In “La reproduction chez les mammifères et l’homme” (eds Thibault C, Levasseur MC), Paris, INRA Editions, pp 256-289.

Daftary SS, Gore AC, 2005. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function . *Exp Biol Med* 230, 292-306.

Dalkin A, Haisenleder D, Yasin M, Gilrain J, Marshall J, 1996. Pituitary activin receptor subtypes and follistatin gene expression in female rats: differential regulation by activin and follistatin. *Endocrinology* 137, 548-554.

Dalkin AC, Haisenleder DJ, Gilrain JT, Aylor K, Yasin M, Marshall JC, 1999. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin subunit gene expression in female rats: actions on follicle-stimulating hormone beta messenger ribonucleic acid (mRNA) involve differential expression of pituitary activin (beta-B) and follistatin mRNAs. *Endocrinology* 140, 903-908.

Dave G, Johansson M, Larsson A, Lewander K, Lidman U, 1974. Metabolic and haematological studies on the yellow and silver shortfin phases of the European eel, *Anguilla anguilla* L. II. Fatty acid composition. *Comp Biochem Physiol* 47B, 583-591.

Davies B, Dickey J, Swanson P, 2000. Regulation of FSH (GTH I) and LH (GTH II) in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): the action of recombinant human activin and a salmon testis extract. In “Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish” (eds Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO) Bergen, University of Bergen, p 486.

Davis AJ, Johnson PA, 1998. Expression pattern of messenger ribonucleic acid for follistatin and the inhibin/activin subunits during follicular and testicular development in *Gallus domesticus*. *Biol Reprod* 59, 271-277.

De Jesus EG, Inui Y, Hirano T, 1990. Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 79, 167-173.

De Jesus EG, Hirano T, Inui Y, 1991. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early

- development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen Comp Endocrinol* 82, 369-376.
- De Jesus EG, Hirano T, Inui Y, 1992. Gonadal steroids delay spontaneous flounder metamorphosis and inhibit T3-induced fin ray shortening *in vitro*. *Zool Sci* 9, 633-638.
- De Jesus EG, Hirano T, Inui Y, 1993. The antimetamorphic effect of prolactin in the Japanese flounder. *Gen Comp Endocrinol* 93, 44-50.
- De Kretser DM, Buzzard JJ, Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Lin SY, Morrison JR, Loveland KL, Hedger MP, 2004. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol* 225, 57-64.
- De Leeuw R, Wurth YA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJT, 1986. The effects of aromatizable androgens, non-aromatizable androgens and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). A physiological and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 243, 587-594.
- De Paolo LV, Shimonaka M, Ling N, 1992. Regulation of pulsatile gonadotropin secretion by estrogen, inhibin, and follistatin (activin-binding protein) in ovariectomized rats. *Biol Reprod* 46, 898-904.
- De Pinna MCC, 1996. Teleostean monophyly. In "Interrelationships of fishes" (eds Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD) Academic press, New York, pp 147-162A.
- De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E, 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 10972-10976.
- De Silva SS, Gunasekera RM, Collins RO, 2002. Some morphometric and biochemical features of ready-to-migrate silver and pre-migratory yellow stages of the shortfin eel of south-eastern Australian waters. *J Fish Biol* 61, 915-928.
- De Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJ, 1996. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 116, 105-114.
- Degani G, Goldberg D, Tzchori I, Hurvitz Yom Din S, Jackson K, 2003. Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH- subunit, and expression of FSH and LH in males and females after sex determination. *Comp Biochem Physiol B* 136, 283-293.
- Denver RJ, 1993. Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin releasing hormone-like peptides. *Gen Comp Endocrinol* 91, 38-51.
- Denver RJ, 1999. Evolution of the corticotropin-releasing hormone signaling system and its role in stress-induced phenotypic plasticity. *Ann NY Acad Sci* 897, 46-53.
- Denver RJ, Licht P, 1989. Neuropeptide stimulation of thyrotropin secretion in the larval bullfrog: evidence for a common regulator of thyroid and interrenal activity during metamorphosis. *J Exp Zool* 252, 101-104.
- Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR, 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6609-6615.
- Dickey JT, Swanson P, 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Mol Endocrinol* 21, 291-306.
- Dickey JT, Swanson P, 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 118, 436-449.
- Dodd MHI, Dodd JM, 1976. The biology of metamorphosis. In "Physiology of Amphibia" (ed Lofts E) New York,

Academic Press pp 467-599.

Donaldson EM, Fagerlund UHM, 1972. Corticosteroid dynamics in Pacific salmon. *Gen Comp Endocrinol Suppl.* 3, 254–265.

Donaldson E, Fagerlund U, Higgs D, McBride J, 1979. Hormonal enhancement of growth. In “Fish Physiology” vol VIII (eds Hoar WS, Randall DJ and Brett JR) New York, Academic Press, pp 456-597.

Douard V, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Guiguen Y, 2004. Molecular evolution of androgen receptors in fish. *Fish Physiol Biochem* 28, 207-208.

Driancourt MA, Gougeon A, Monniaux D, Royère D, Thibault C, 2001. Folliculogénèse et ovulation. In “La reproduction chez les mammifères et l’homme” (eds Thibault C, Levasseur MC), Paris, INRA Editions, pp 316-347.

Dubois EA, Florijn MA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJTh, 1998. Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *Gen Comp Endocrinol* 112:383-393.

Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Hassing I, van Dijk W, Schulz RW, Goos HJ, 2000. Gonadotropin-releasing hormone fibers innervate the pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*) during puberty. *Neuroendocrinology* 72, 252-262.

Dubois EA, Slob S, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ, 2001. Gonadal steroids and the maturation of the species-specific gonadotropin-releasing hormone system in brain and pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comp Biochem Physiol* 129B, 381-387.

Dufour S, 1985. La fonction gonadotrope de l’anguille européenne, *Anguilla anguilla* L., au stade argneté (au moment du départ pour la migration de reproduction): les mécanismes de son blocage et sa stimulation expérimentale. PhD thesis University Paris VI.

Dufour S, 1994. Neuroendocrinologie de la reproduction de l’anguille: de la recherche fondamentale aux problèmes appliqués. *Bull Fr Pêche Pisc* 335, 187-211.

Dufour S, Fontaine YA, 1985. La migration de reproduction de l’anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.): un rôle probable de la pression hydrostatique dans la stimulation de la fonction gonadotrope. *Bull Soc Zool Fr* 110, 291-299.

Dufour S, Rousseau K, 2007. Neuroendocrinology of fish metamorphosis and puberty: evolutionary and ecophysiological perspectives. *J Mar Sci Technol* 55-68.

Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine Y-A, 1983a. Development of the heterologous radioimmunoassay for eel (*Anguilla anguilla*) gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 49, 404-413.

Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA, 1983b. Effects of steroid hormones on the pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol* 52, 190-197.

Dufour S, Fontaine YA, Kerdelhué B, 1985. Increase in brain and pituitary radioimmunoassayable gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the European silver eel treated with sexual steroid or human chorionic gonadotropin. *Neuropeptides* 6, 495-502.

Dufour S, Lopez E, Le Menn F, Le Belle N, Baloché S, Fontaine YA, 1988. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen Comp Endocrinol* 70, 20-30.

Dufour S, Le Belle N, Baloché S, Fontaine YA, 1989. Positive feedback control by gonads on gonadotropin and gonadoliberin levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol Biochem* 7, 157-162.

Dufour S, Bassompierre M, Montero M, Le Belle N, Baloche S, Fontaine YA, 1991. Stimulation of pituitary gonadotropic function in female silver eels treated by a gonadoliberin agonist and dopamine antagonist. In "Proc 4th Int Symp Reproductive Physiology of Fish" (Eds Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS) Sheffield, pp 54-56.

Dufour S, Montero M, Le Belle N, Bassompierre M, King JA, Millar RP, Peter RE, Fontaine YA, 1993. Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol Biochem* 11, 99-106.

Dufour S, Huang YS, Rousseau K, Sbaihi M, Le Belle N, Vidal B, Marchelidon J, Quérat B, Burzawa-Gerard E, Chang CF, Schmitz M, 2000. Puberty in teleosts : new insights into the role of peripheral signals in the stimulation of pituitary gonadotropins. In "Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish" (eds Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E and Stefansson SO), Bergen, pp. 455-461.

Dufour S, Burzawa-Gerard E, Le Belle N, Sbaihi M, Vidal B, 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In « Eel Biology » (eds Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K) Tokyo, Springer, pp 373-383.

Dufour S, Weltzien FA, Sébert ME, Le Belle N, Vidal B, Vernier P, Pasqualini C, 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in Teleost fishes. Ecophysiological and evolutionary implications. *Ann NY Acad Sci* 1040, 9-21.

Durif C, Dufour S, Elie P, 2005. The silvering process of the European eel : a new classification from the yellow resident stage to the silver migrating stage. *J Fish Biol* 66, 1-19.

E

Eagle RC, Tortonese DJ, 2000. Characterization and Distribution of Gonadotrophs in the Pars Distalis and Pars Tuberalis of the Equine Pituitary Gland During the Estrous Cycle and Seasonal Anestrus. *Biol Reprod* 63, 826 - 832.

Eddy L, Lipner H, 1976. Amphibian metamorphosis: role of thyrotropin-like hormone. *Gen Comp Endocrinol* 29, 333-336.

Edel RK, 1975. The induction of maturation of female American eels through hormone injections. *Helgoland Marine Research* 27, 131-138.

Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P, 2004. Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. *Mar Ecol Prog ser* 282, 261-270.

Edeline E, Bardonnat A, Bolliet V, Dufour S, Elie P, 2005. Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. *Horm Behav* 48, 53-63.

Egginton S, 1986. Metamorphosis of the American eel, *Anguilla rostrata* Lesueur. I. Changes in metabolism of skeletal muscle. *J Exp Zool* 237, 173-184.

Elie P, Lecomte-Finiger R, Cantrelle I, Charlon N, 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires Durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (poisson téléostéen anguilliforme). *Vie et Milieu* 32, 149-157.

Elizur A, Zmora N, Rosenfeld H, Meiri I, Hassin S, Gordin H, Zohar Y, 1996. Gonadotropins beta-GtHI and beta-GtHII from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 102, 39-46.

Esch FS, Shimasaki S, Mercado M, Cooksey K, Ling N, Ying S, Ueno N, Guillemain R, 1987. Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol Endocrinol* 1, 849-55.

F

Fernández-Vázquez G, Kaiser UB, Albarracín CT, Chin WW, 1996. Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol Endocrinol* 10, 356-66.

- Fevold HL, Hisaw FL, Leonard SL, 1931. The gonad-stimulating and luteinizing hormones of anterior lobe of the hypophysis. *AM J Physiol* 97, 291-301.
- Filby AL, Tyler CR, 2005. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biol Reprod* 73, 648-662.
- Filby AL, van Aerle R, Duitman JW, Tyler CR, 2008. The Kisspeptin/Gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biol Reprod* 78, 278-289.
- Fontaine M, 1936. Sur la maturation complète des organes génitaux de l'anguille mâle et l'émission spontanée de ses produits sexuels. *CR Acad Sci Paris* 202, 1312-1315.
- Fontaine M, 1953. La fonction hypophyso-thyroïdienne des poissons dans ses rapports avec leur morphologie et leur comportement. *Journal du conseil international pour l'exploitation de la mer* 19, 23-38.
- Fontaine M, 1975. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. In *Advances in Marine Biology*, vol 13 (eds Russell FS, Younge M) New York, Academic Press, pp 241-355.
- Fontaine M, 1985. Action de facteurs anormaux du milieu sur l'écophysiologie d'anticipation des poissons migrateurs amphihalins. *Ichthyophysiologica Acta* 9, 11-25.
- Fontaine M, Callamand O, 1941. Sur l'hydrotropisme des civelles. *Bull Inst Océanogr* 811, 1-6.
- Fontaine M, Leloup J, 1960. Etude du pouvoir de concentration des iodures par la thyroïde de deux salmonidés, la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* Rich) et le jeune saumon (*Salmo salar* L.). *Arch Sci Physiol* 14, 15-24.
- Fontaine M, Olivereau M, 1962. Nutrition et sexualité chez les poissons. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* 16, A125-A152.
- Fontaine M, Bertrand E, Lopez E, Callamand O, 1964. Sur la stimulation des organes génitaux de l'anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des œufs en aquarium. *CR Acad Sci Paris* 259, 2907-2910.
- Fontaine YA, 1980. Les hormones gonadotropes de l'hypophyse: biochimie et biologie comparées ; spécificité et évolution. *Reprod Nutr Dévelop* 20, 381-418.
- Fontaine Y-A, 1994. L'argenteur de l'anguille : métamorphose, anticipation, adaptation. *Bull Fr Pêche Piscicult* 335, 171-185.
- Fontaine YA, Burzawa-Gerard E, 1978. Biochemical and biological properties of fish gonadotropins and their subunits : comparison with mammalian hormones. In "Structure and function of the gonadotropins" (eds McKerns KW) New York, Plenum press, pp 361-380.
- Fontaine YA, Dufour S, 1991. The eels: from life cycle to reproductive endocrinology. *Bull Inst Zool Acad Sinica* 16, 237-248.
- Fontaine YA, Lopez E, Delerue-Le Belle N, Fontaine-Bertrand E, Lallier F, Salmon C, 1976. Stimulation gonadotrope de l'ovaire chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) hypophysectomisée. *J Physiol* 72, 871-892.
- Fontaine YA, Pisam M, Le Moal C, Rambourg A, 1995. Silvering and gill "mitochondria-rich" cells in the eel, *Anguilla anguilla*. *Cell Tissue Res* 281, 465-471.
- Foster CM, Phillips DJ, Wyman T, Evans LW, Groome NP, Padmanabhan V, 2000. Changes in serum inhibin, activin and follistatin concentrations during puberty in girls. *Hum Reprod* 15, 1052-1057.
- Friedman JM, 2002. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60, S1-S14; discussion

S68–S84,85.

Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL, 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1357-1363.

Funkenstein B, Rebhan Y, Skopal T, 2008. Molecular cloning and characterization of follistatin in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Mol Biol Rep* In press

Furukuma S, Onuma T, Swanson P, Luo Q, Koide N, Okada H, Urano A, Ando H, 2008. Stimulatory effects of insulin-like growth factor 1 on expression of gonadotropin subunit genes and release of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in masu salmon pituitary cells early in gametogenesis. *Zoolog Sci* 25, 88-98.

G

García Ayala A, Villaplana M, García Hernández MP, Chaves Pozo E, Agulleiro B, 2003. FSH-, and LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 134, 72-79.

García-Hernández MP, Koide Y, Díaz MV, Kawauchi H, 1997. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). *Gen Comp Endocrinol* 106, 389-399.

García Hernández MP, García Ayala A, Zandbergen MA, Agulleiro B, 2002. Investigation into the duality of gonadotropic cells of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Gen Comp Endocrinol* 128, 25-35.

Garg RR, Bally-Cuif L, Lee SE, Gong Z, Ni X, Hew CL, Peng C, 1999. Cloning of zebrafish activin type IIB receptor (ActRIIB) cDNA and mRNA expression of ActRIIB in embryos and adult tissues. *Mol Cell Endocrinol* 153, 169-181.

Ge W, 2000. Roles of the activin regulatory system in fish reproduction. *Can J Physiol Pharmacol* 78, 1077-1085.

Ge W, Peter RE, 1994. Activin-like peptides in somatotrophs and activin stimulation of growth hormone release in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 95, 213-221.

Ge W, Chang JP, Peter RE, Vaughan J, Rivier J, Vale W, 1992. Effects of porcine follicular fluid, inhibin-A, and activin-A on goldfish gonadotropin release *in vitro*. *Endocrinology* 131, 1922-1929.

Ge W, Cook H, Peter RE, Vaughan J, Vale W, 1993. Immunocytochemical evidence for the presence of inhibin and activin-like proteins and their localization in goldfish gonads. *Gen Comp Endocrinol* 89, 333-340.

Ge W, Miura T, Kobayashi H, Peter RE, Nagahama Y, 1997. Cloning of cDNA for goldfish activin βB subunit, and the expression of its mRNA in gonadal and non-gonadal tissues. *J Mol Endocrinol* 19, 37-45.

Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, and Kagawa H, 2000. Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biology of reproduction* 63, 308-319.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW, 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11, 177-199.

Gielsen JT, Goos HJ, Peute J, Van den Bosch RA, Van Oordt PG, 1982. The brain-pituitary-gonadal axis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: gonadal hormones and the maturation of gonadotropic cells. *Cell Tissue Res* 225, 45-56.

Godin JG, Dill PA, Drury DE, 1974. Effects of thyroid hormones on behaviour of yearling Atlantic salmon *Salmo*

salar L. J Fish Res Bd Can 31, 1787-1790.

Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail P-Y, Breton B, Le Gac F, 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 113, 413-428.

Gong C, Cao G, Xue R, Zhang C, 2002. Sequence and structure of encoding eel growth hormone gene. Shuichan Xuebao 26, 295-300.

Gonzalez-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W, 1991. Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. Neuroendocrinology 54, 373-377.

Goos HJ, 1987. Steroid feedback on pituitary gonadotropin secretion. In "Proceedings of the third international symposium on reproductive physiology of fish" (Eds, Idler DR, Crim LW, Walsh J). Fish Symposium, St John's, Newfoundland, pp. 16-20.

Goos HJ, Schultz R, 1997. Gonadal steroid hormones drive puberty in fish. In "Advances in Comparative Endocrinology" (Eds Kawashima S, Kikuyama S) Bologna, pp. 1429-1433.

Goos HJT, Consten D, 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. Mol Cell Endocrinol 197, 105-116.

Goos HJT, De Leeuw R, Cook H, Van Oordt PGWJ, 1986. Gonadotropic hormone-releasing hormone (GnRH) bioactivity in the brain of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*: the effect of testosterone. Gen Comp Endocrinol 64, 80-84.

Gorbman A, Sower SA, 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) biology. Gen Comp Endocrinol 134, 207-213

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA, 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 145, 4073-4077.

Gray PC, Bilezikjian LM, Vale W, 2001. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. Mol Cell Endocrinol 188, 254-60.

Gregory DJ, Waldbieser GC, Bosworth BG, 2004. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. Anim Genet 35, 425-430.

Gregory SJ, Kaiser UB, 2004. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. Semin Reprod Med 22, 253-267.

Gudernatsch JF, 1912. Feeding experiments on tadpoles: the influence of specific organs given as food on growth and differentiation : a contribution to the knowledge of organs of internal secretion. Wilhelm Roux' Arch Entwi Mech Org 35, 457-483.

Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM, 1998. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. Mol. Endocrinol. 12, 96-106.

Gutiérrez-Pascual E, Martínez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagón MM, Castaño JP, 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. J Neuroendocrinol 19, 521-530.

H

Halm S, Martinez-Rodriguez G, Rodriguez L, Prat F, Mylonas CC, Carrillo M, Zanuy S, 2004. Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER alpha, ER beta 1 and ER beta 2) in the European

sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Mol Cell Endocrinol 223, 63-75.

Han YS, Liao IC, Huang YS, Tzeng WN, Yu JYL, 2003. Profiles of PGH-, GTH I- β , and GTH II- β transcript levels at different ovarian stages in the wild female Japanese eel, *Anguilla japonica*. Gen Comp Endocrinol 133, 8-16.

Han YS, Liao IC, Tzeng WN, Huang YS, Yu JYL, 2003. Serum estradiol-17 β and testosterone levels during silvering in wild Japanese eel *Anguilla japonica*. Comp Biochem Physiol 136B, 913-920.

Han YS, Liao IC, Tzeng WN, Yu JYL, 2004. Cloning of the cDNA for thyroid stimulating hormone β subunit and changes in activity of the pituitary-thyroid axis during silvering of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. J Mol Endocrinol 32, 179-194.

Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC, 1987. Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. Endocrinology 120, 491-496.

Haro A, 2003. Downstream migration of silver-phase anguillid eels. In "Eel Biology" (eds Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K). Springer, Tokyo, pp 215-222.

Hassin S, Elizur A, Zohar Y, 1995. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits. J Mol Endocrinol 15, 23-35.

Hassin S, Gothilf Y, Blaise O, Zohar Y, 1998. Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimized ribonuclease protection assay. Biol Reprod 58, 1233-1240.

Hassin S, Holland MCH, Zohar Y, 1999. Ontogeny of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression during pubertal development in the female Striped Bass, *Morone saxatilis* (Teleostei). Biol Reprod 61, 1608-1615.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P, 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proc Natl Acad Sci USA 97, 10751-10756.

Hayes TB, 1997. Amphibian metamorphosis : an historical perspective. Am Zool 37, 121-124.

Hellqvist A, Schmitz M, Mayer I, Borg B, 2006. Seasonal changes in expression of LH-b and FSH-b in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Gen Comp Endocrinol 145, 263-269.

Hiney JK, Ojeda SR, Dees WL, 1991. Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. Neuroendocrinology 54, 420-423.

Hoar WS, 1939. The thyroid gland of the Atlantic salmon. J Morphol 65, 257-295.

Hoar WS, 1988. The physiology of smolting salmonids. In "Fish Physiology", vol 11B (eds WS Hoar and DJ Randall), academic press, New York, pp 275-343.

Hoheisel G, Sterba G, 1963. Uber die Wirkung von Kaliumperchlorat (KClO₄) auf Ammonoeten von Lampetra planeri Bloch. Z Mikrosk-Anat Forsch 70, 490-516.

Holland MC, Hassin S, Zohar Y, 1998. Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). Biol Reprod 59, 1153-1162.

Holland MC, Hassin S, Zohar Y, 2001. Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. J Endocrinol 169, 527-538.

- Horton EW, 1934. On the relation of the thyroid gland to metamorphosis in lampreys. *J Exp Biol* 11, 247-261.
- Huang HJ, Sebastian J, Strahl BD, Wu JC, Miller WL, 2001. Transcriptional regulation of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by activin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of two proximal activator protein-1 sites for GnRH stimulation. *Endocrinology* 142, 2267-74.
- Huang L, Schreiber AM, Soffientino B, Bengtson DA, Specker JL, 1998. Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): thyroid status and the timing of gastric gland formation. *J Exp Zool* 280, 413-420.
- Huang YS, 1998. Rôle des stéroïdes sexuels et des hormones métaboliques dans le contrôle direct hypophysaire de l'hormone gonadotrope (GtH-II) chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6.
- Huang YS, Schmitz M, Le Belle N, Chang CF, Quérat B, Dufour S, 1997. Androgens stimulate gonadotropin-II β -subunit in eel pituitary cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 131, 157-166.
- Huang YS, Rousseau K, Le Belle N, Vidal B, Burzawa-Gérard E, Marchelidon J, Dufour S, 1998. Insulin-like growth factor-I stimulates gonadotrophin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty. *J Endocrinol* 159, 43-52.
- Huang YS, Rousseau K, Sbailhi M, Le Belle N, Schmitz M, Dufour S, 1999. Cortisol selectively stimulates pituitary gonadotropin beta-subunit in a primitive teleost, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology* 140, 1228-1235.
- Huertas M, Scott AP, Hubbard PC, Canario AVM, Cerda J, 2006. Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: Possible involvement of chemical communication. *Gen Comp Endocrinol* 147, 304-313.
- Huggard D, Khakoo Z, Kassam G, Mahmoud SS, Habibi HR, 1996. Effect of testosterone on maturational gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. *Biol Reprod* 54, 1184-1191.
- Huggard-Nelson DL, Nathwani PS, Kermouni A, Habibi HR, 2002. Molecular characterization of LHbeta and FSHbeta subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 188, 171-193.
- Huising MO, Geven EJ, Kruiswijk CP, Nabuurs SB, Stolte EH, Spanings FA, Verburg-van Kemenade BM, Flik G, 2006. Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology* 147, 5786-5797.
- I**
- Ijiri S, Kazeto Y, Takeda N, Chiba H, Adachi S, Yamauchi K, 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 135, 3-16.
- Ikemoto T, Park MK, 2005. Identification and molecular characterization of three GnRH ligands and five GnRH receptors in the spotted green pufferfish. *Mol Cell Endocrinol* 242, 67-79.
- Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y, 1999. cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype. *J Biol Chem* 274, 25205-25209.
- Ikuta K, Aida K, Okumoto N, Hanyu I, 1987. Effects of sex steroids on the smoltification of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Gen Comp Endocrinol* 65, 99-110.
- Illing N, Troskie BE, Nahorniak CS, Hapgood JP, Peter RE, Millar RP, 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2526-2531.

Inui Y, Miwa S, 1985. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen Comp Endocrinol* 60, 450-454.

Iwata M, Yamanome T, Tagawa M, Ida H, Hirano T, 1989. Effects of thyroid hormones on phototaxis of chum and coho salmon juveniles. *Aquaculture* 82, 329-338.

J

Jackson K, Goldberg D, Ofir M, Abraham M, Degani G, 1999. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic b subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J Mol Endocrinol* 23, 177-187.

Jalabert B, 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Dev* 45, 261-279.

Jegstrup IM, Rosenkilde P, 2003. Regulation of post-larval development in the European eel: thyroid hormone level, progress of pigmentation and changes in behaviour. *J Fish Biol* 63, 168-175.

Jeng SR, Chen GR, Lai JY, Huang YS, Dufour S, Chang CF, 2002. Regulation of pituitary gonadotropin II and growth hormone content by sex steroids and pituitary extract in the aquacultured Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 209, 319-332.

Jeng SR, Dufour S, Chang CF, 2005. Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Exp Zool* 303, 802-812.

Jeng SR, Yueh WS, Chen GR, Lee YH, Dufour S, Chang CF, 2007. Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gen Comp Endocrinol* 154, 161-173.

Jodo A, Ando H, Urano A, 2003. Five different types of putative GnRH receptor gene are expressed in the brain of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Zoolog Sci* 20, 1117-1125.

Jodo A, Kitahashi T, Taniyama S, Ueda H, Urano A, Ando H, 2005. Seasonal changes in expression of genes encoding five types of gonadotropin-releasing hormone receptors and responses to GnRH analog in the pituitary of masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 144, 1-9.

Johnson LM, Sidnam RL, 1979. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. *Biol Reprod* 20, 552-559.

Jollès J, Burzawa-Gerard E, Fontaine YA, Jollès P, 1977. The evolution of gonadotropins: some molecular data concerning a non-mammalian pituitary gonadotropin, the hormone from a teleost fish (*Cyprinus carpio* L.). *Biochimie* 59, 893-898.

K

Kagawa H, Kawazoe I, Tanaka H, Okuzawa K, 1998. Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GtHI and GtHII) in the pituitary of bluefin tuna, *Thunnus thunnus*. *Gen Comp Endocrinol* 110, 11-18.

Kah O, Chambolle P, Thibault J, Geffard M, 1984. Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. *Neurosci Letters* 48, 293-298.

Kah O, Dubourg P, Onteniente B, Geffard M, Calas A, 1986. The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell Tissue Res* 244, 577-582.

Kah O, Dulka JG, Dubourg P, Thibault J, Peter RE, 1987. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45, 451-458.

- Kah O, Dufour S, Baloche S, Breton B, 1989. The GnRH systems in the brain and pituitary of normal and hCG-treated European silver eels. *Fish Physiol Biochem* 6, 279-284.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ, 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa : A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153, 346-364.
- Kaiser UB, Lee BL, Carroll RS, Unabia G, Chin WW, Childs GV, 1992. Follistatin gene expression in the pituitary : localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology* 130, 3048-3056.
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, Aida K, 2001. cDNA cloning of two gonadotropin subunits (GTH-I and GTH-II) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 122, 117-129.
- Kanamori A, Brown DD, 1996. The analysis of complex developmental programmes: amphibian metamorphosis. *Genes to Cells* 1, 429-435.
- Kaneko T, Hasegawa S, Sasai S, 2003. Chloride cells in the Japanese eel during their early stages and downstream migration. In "Eel Biology" (eds Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K). Springer, Tokyo, pp. 457-468.
- Kapsimali M, Vidal B, Gonzalez A, Dufour S, Vernier P, 2000. Distribution of mRNA encoding the four Dopamine D1 receptor subtypes in the brain of the European Eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D1 receptors in vertebrates. *J Comp Neurol* 419, 320-343.
- Katzman S, Cech JJ Jr, 2001. Juvenile coho salmon locomotion and mosaic muscle are modified by 3',3',5'-tri-iodo-L-thyronine (T3). *J Exp Biol* 204, 1711-1717.
- Kawauchi H, Sower S, 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohipophysis. *Gen Comp Endocrinol* 148, 3-14.
- Khan IA, Lopez E, Leloup-Hatey J, 1987. Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen Comp Endocrinol* 68, 91-103.
- Khan IA, Thomas P, 1992. Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. *Gen Comp Endocrinol* 88, 388-396.
- Kikuchi M, Kobayashi M, Ito T, Kato Y, Ishii S, 1998. Cloning of complementary deoxyribonucleic acid for the follicle-stimulating hormone beta subunit in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* 111, 376-385.
- Kikuyama S, Kawamura K, Tanaka S, Yamamoto K, 1993. Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. *Int Rev Cytol* 145, 105-148.
- King JA, Dufour S, Fontaine YA, Millar RP, 1990. Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Peptides* 11, 507-514.
- Kitajima C, Sato T, Kawanishi M, 1967. On the effect of thyroxine to promote the metamorphosis of a conger eel-preliminary report. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 33, 919-922.
- Kleckner RC, 1980a. Swimbladder wall guanine enhancement related to migratory depth in silver phase *Anguilla rostrata*. *Comp Biochem Physiol A* 65, 351-354.
- Kleckner RC, 1980b. Swimbladder volume maintenance related to initial oceanic migratory depth in silver-phase *Anguilla rostrata*. *Science* 208, 1481-1482.
- Kleckner RC, Krueger WH, 1981. Changes in swimbladder retial morphology in *Anguilla rostrata* during premigration metamorphosis. *J Fish Biol* 18, 569-577.

- Knight P, 1996. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol* 17, 476-509.
- Knowles EGW, 1939. The influence of anterior-pituitary and testicular hormones on the sexual maturation of lampreys. *J Exp Biol* 16, 535-547.
- Knowles EGW, 1941. The duration of larval life in ammocoetes and attempt to accelerate metamorphosis by injections of an anterior-pituitary extract. *Proc Zool Soc Lond Ser A* 111, 101-109.
- Kobayashi M, Stacey NE, 1990. Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool Sci* 7, 715-721.
- Kobayashi M, Sohn YC, Yoshiura Y, Aida K, 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fish Sci* 66, 223-231.
- Kobayashi T, Andersen O, 2008. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), 1: Isolation of multiple transcripts encoding full-length and truncated variants of FSH-R. *Gen Comp Endocrinol* 156, 584-594.
- Kogawa K, Nakamura T, Sugino K, Takio K, Titani K, Sugino H, 1991. Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology* 128,1434-40.
- Koide Y, Itoh H, Kawauchi H, 1993. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTH-I and GTH-II, from bonito (*Katsuwonus plelamis*) pituitary glands. *Int J Peptide Prot Res* 41, 52-65.
- Koide Y, Papkoff H, Kawauchi H, 1996. Complete amino acid sequences of follitropin and lutropin in the ostrich, *Struthio camelus*. *Eur J Biochem* 240, 262–267.
- Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M, 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276, 34631-6.
- Kubota SS, 1961. Studies on the ecology, growth and metamorphosis in conger eel, *Conger myriaster* (Brevoort). *J Fac Fish Mie Prefectural Univ* 5, 190-370.
- Kumakura N, Okuzawa K, Gen K, Kagawa H, 2003. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of prepubertal female red seabream (*Pagrus major*). *Gen Comp Endocrinol* 131, 264-273.
- Kumar RS, Ijiri S, Trant JM, 2001a. Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. *Biol Reprod* 64, 1010-1018.
- Kumar RS, Ijiri S, Trant JM, 2001b. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor. *Biol Reprod* 65, 710-717.
- Kumar TR, Agno J, Janovick JA, Conn PM, Matzuk MM, 2003. Regulation of FSH β and GnRH receptor gene expression in activin receptor II knockout male mice. *Mol Cell Endocrinol* 212, 19-27.
- Kurokawa T, Uji S, Suzuki T, 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides* 26, 745-750.
- Kusakabe M, Nakamura I, Evans J, Swanson P, Young G, 2006. Changes in mRNAs encoding steroidogenic regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout

testes. *J Endocrinol* 189, 541-554.

Kwok HF, So WK, Wang Y, Ge W, 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors--evidence for their distinct functions in follicle development. *Biol Reprod* 72, 1370-1381.

L

Laan M, Richmond H, He C, Campbell RK, 2002. Zebrafish as a model for vertebrate reproduction: characterization of the first functional zebrafish (*Danio rerio*) gonadotropin receptor. *Gen Comp Endocrinol* 125, 349-364.

Lackey BR, Gray SL, Henricks DM, 1999. The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 201-217.

Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW, 1994. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 369, 455-461.

Larsen LO, Dufour S, 1993. Growth, reproduction and death in lampreys and eels. In "Fish Ecophysiology" (eds Rankin JC, Jensen FB) Chapman and Hall, pp 72-104.

Larsen DA, Swanson P, 1997. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Onchorynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 108, 152-160.

Lau MT, Ge W, 2005. Cloning of Smad2, Smad3, Smad4, and Smad7 from the goldfish pituitary and evidence for their involvement in activin regulation of goldfish FSH promoter activity. *Gen Comp Endocrinol* 141, 22-38.

Leach J, 1946. Oxygen consumption of lampreys, with special reference to metamorphosis and phylogenetic position. *Physiol Zool* 19, 365-374.

Leatherland JE, Hilliard RW, Macey DJ, Potter IC, 1990. Changes in serum thyroxine and triiodothyronine concentrations during metamorphosis of the Southern Hemisphere lamprey *Geotria australis*, and the effect of propylthiouracil, triiodothyronine and environmental temperature on serum thyroid hormone concentrations of ammocoetes. *Fish Physiol Biochem* 8, 167-177.

Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gérard A, Parent AS, Junien JL, Bourguignon JP, 2000. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. *Endocrinology* 141, 1464-1469.

Lecomte-Finiger R, 1990. Métamorphose de l'anguille jaune en anguille argentée (*Anguilla anguilla* L.) et sa migration catadrome. *Ann Biol* 29, 183-194.

Lecomte-Finiger R, 1992. Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Marine Biology* 114, 205-210.

Lee BL, Unabia G, Childs G, 1993. Expression of follistatin mRNA by somatotropes and mammatropes early in the rat estrous cycle. *J Histochem Cytochem* 41, 955-960.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR, 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88, 1731-1737.

Lee YH, Du JL, Shih YS, Jeng SR, Sun LT, Chang CF, 2004. In vivo and in vitro sex steroids stimulate seabream gonadotropin-releasing hormone content and release in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Gen Comp Endocrinol* 139, 12-19.

Legendre M, Jalabert B, 1988. Physiologie de la reproduction. In "Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains" (eds Lévêque C, Bruton MN, Ssentongo GW), Paris, Orstom, pp 153-175.

- Leloup J, de Luze A, 1980. Prolactine et hormones thyroïdiennes chez l'anguille, *Anguilla anguilla*. Cr Acad Fr 291, 87-90.
- Leloup-Hatey J, Hardy A, Nahoul K, Quérat B, Zohar Y, 1986. Influence of gonadotrophic treatment upon the ovarian steroidogenesis in European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). In "Reproduction chez les poissons. Bases fondamentales et appliquées en endocrinologie et génétique" Les colloques de l'INRA, n°44. Tel-Aviv, pp. 127-130.
- Leloup-Hatey J, Hardy A, Quérat B, 1989. Responses of gonado-somatic indices and plasma levels of sex steroids to gonadotrophic stimulation in freshwater European eel at yellow and silver stages. Gen Comp Endocrinol 74, 251.
- Lema SC, Nevitt GA, 2004. Evidence that thyroid hormone induces olfactory cellular proliferation in salmon during a sensitive period for imprinting. J Exp Biol 207, 3317-3327.
- Lescheid DW, Powell JFF, Fischer WH, Park M, Craig A, Bokovskaya O, Barannikova IA, Sherwood NM, 1995. Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) identified by primary structure in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*. Regul Peptides 55, 299-309.
- Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O, 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. Gen Comp Endocrinol 135, 1-16.
- Levavi-Sivan B, Biran J, Fireman E, 2006. Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine d2 receptors in female tilapia pituitary. Biol Reprod 75, 642-50.
- Lewander K, Dave G, Johansson ML, Larsson A, Lidman U, 1974. Metabolic and hematological studies on the yellow and silver phases of the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. Comp Biochem Physiol B47, 571-581.
- Li MD, Ford JJ, 1998. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the alpha- and beta-subunits of glycoprotein hormone gene family. J Endocrinol 156, 529-542.
- Licht P, 1979. Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians: gonadotropins. Annu Rev Physiol 41, 337-351.
- Lin HR, Van der Kraak G, Zhou XJ, Liang JY, Peter RE, Rivier JE, Vale WW, 1988. Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozone or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen Comp Endocrinol 69, 31-40.
- Lin HR, Xie G, Zhang LH, Wang XD, Chen LX, 1998. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel (*Anguilla japonica* T & S). Bull Fr Peche Piscic 349, 163-176.
- Lin YS, Poh YP, Tzeng CS, 2001. A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genes. Mol Phylogenet Evol 20, 252-261.
- Linard B, Bennami S, Saligaut C, 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 99, 192-196.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R, 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. Nature 321, 779-782.
- Lintlop SP, Youson JH, 1983. Concentration of triiodothyronine in the sera of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the brook lamprey, *Lampetra lamottenii* at various phases of their life cycle. Gen Comp Endocrinol 49, 187-194.
- Liu YC, Kato Y, Inoue K, Tanaka S, Kurosumi K, 1988. Co-localization of LH beta and FSH beta mRNAs in the porcine anterior pituitary by in situ hybridization with biotinylated probes. Biochem Biophys Res Com 154, 80-84.

Liu Z, Kim S, Karsi A, 2001. Channel catfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: complementary DNA cloning and expression during ovulation. *Mar Biotechnol* 3, 590-599.

Loir M, 1999. Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol Reprod Dev* 53, 434-442.

Lokman PM, Vermeulen GI, Lambert JGD, Young G, 1998. Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish Physiol Biochem* 19, 325-338.

Lokman PM, Young G, 2000. Induced spawning and early ontogeny of New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*). *New Zeal J Mar Fresh Res* 34, 135-145.

Lokman PM, Wass RT, Suter HC, Scott SG, Judge KF, Young G, 2001. Changes in steroid hormone profiles and ovarian histology during salmon pituitary-induced vitellogenesis and ovulation in female New Zealand longfinned eels, *Anguilla dieffenbachii*. *J Exp Zool* 289, 119-129.

Lopez E, Fontaine YA, 1990. Stimulation hormonale *in vivo* de l'ovaire d'anguille européenne au stade jaune. *Reprod Nutr Dev* 30, 577-582.

Lowell TM, Knight PG, Gladwell RT, 2005. Variation in pituitary expression of mRNAs encoding the putative inhibin co-receptor (betaglycan) and type-I and type-II activin receptors during the chicken ovulatory cycle. *J Endocrinol* 186, 447-455.

Luna AM, Wilson DM, Wibbelsman CJ, Brown RC, Nagashima RJ, Hintz RL, Rosenfeld RG, 1983. Somatomedins in adolescence: a cross-sectional study of the effect of puberty on plasma insulin-like growth factor I and II levels. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 268-271.

Lundqvist H, Clarke WC, Johansson H, 1988. The influence of precocious sexual maturation on survival to adulthood of river stocked Baltic salmon, *Salmo salar*, smolts. *Ecography* 11, 60-69.

Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M, 2007. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 148, 4601-4611.

Lythgoe JN, 1979. *The ecology of vision*. Oxford, Clarendon Press.

M

MacConell LA, Lawson MA, Mellon PL, Roberts VJ, 1999. Activin A regulation of gonadotropin-releasing hormone synthesis and release in vitro. *Neuroendocrinology* 70, 246-254.

Macfarland LA, Mann DR, 1977. The inhibitory effects of ACTH and adrenalectomy on reproductive maturation in female rats. *Biol Reprod* 16, 306-314.

Madigou T, Mananos-Sanchez E, Hulshof S, Anglade I, Zanuy S, Kah O, 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 63, 1857-1866.

Madsen SS, Skovbølling S, Nielsen C, Korsgaard B, 2004. 17- β estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquat Tox* 68, 109-120.

Magliulo-Cepriano L, Schreiberman MP, Blüm V, 1994. Distribution of variant forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone and β -gonadotropins I and II in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. *Gen Comp Endocrinol* 94, 135-150.

Manzon RG, Denver RJ, 2004. Regulation of pituitary thyrotropin gene expression during *Xenopus* metamorphosis: negative feedback is functional throughout metamorphosis. *J Endocrinol* 182, 273-285.

- Marcano D, Guerrero HY, Gago N, Cardillo E, Requena M, Ruiz L, 1995. Monoamine metabolism in the hypothalamus of the juvenile teleost fish, *Chaetodipterus faber*. In "Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish" (eds Goetz FW, Thomas P), Austin, Texas, pp. 64-66.
- Marchelidon J, Salesse R, Garnier J, Burzawa-Gerard E, Fontaine YA, 1979. Zoological origin of gonadotropin subunits and association kinetics. *Nature* 281, 314-315.
- Marchelidon J, Schmitz M, Houdebine LM, Vidal B, Le Belle N, Dufour S, 1996. Development of a radioimmunoassay for European eel growth hormone and application to the study of silvering and experimental fasting. *Gen Comp Endocrinol* 102, 360-369.
- Marchelidon J, Le Belle N, Hardy A, Vidal B, Sbaihi M, Burzawa-Gerard E, Schmitz M, Dufour S, 1999. Etude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison : application à la caractérisation du stade argenté. *Bull Fr Pêche Piscicult* 355, 349-368.
- Martinez AS, Cutler CP, Wilson GD, Phillips C, Hazon N, Cramb G, 2005. Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression. *Biol Cell* 97, 615-627.
- Massagué J, 1996. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85, 947-50.
- Mateos J, Mananos E, Carrillo M, Zanuy S, 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comp Biochem Physiol* 132, 75-86.
- Mateos J, Mananos E, Martinez-Rodriguez G, Carillo M, Querat B and Zanuy S, 2003. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (LH, and FSH) and their expression during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinology* 133, 216-232.
- Mathews LS, 1994. Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocr Rev* 15, 310-332.
- Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T, 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 383-388.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV, 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43, 1334-1339.
- Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A, 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374, 356-360.
- Maugars G, Schmitz M, 2006. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Gen Comp Endocrinol* 149, 108-117.
- Maugars G, Schmitz M, 2007. Expression of gonadotropins and gonadotropin receptor genes during early sexual maturation in male Atlantic salmon parr. *Mol Reprod Dev* 75, 403-413.
- Mayer I, Berglund I, Rydevik M, Borg B, Schulz R, 1990. Plasma levels of five androgens and 17a-hydroxy-20b-dihydroprogesterone in immature and mature male Baltic salmon (*Salmo salar*) parr, and the effects of castration and androgen replacement in mature parr. *Can J Zool* 68, 263-267.
- McAndrews JM, Ringstrom SJ, Dahl KD, Schwartz NB, 1994. Corticosterone in vivo increases pituitary follicle-stimulating hormone (FSH)-beta messenger ribonucleic acid content and serum FSH bioactivity selectively in female rats. *Endocrinology* 134, 158-163.

- McArdle CA, Franklin J, Green L, Hislop JN, 2002. Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J Endocrinol* 173, 1-11.
- Mc Cleave JD, Kleckner RC, Castonguay M, 1987. Reproductive sympatry of American and European eels and implications for migration and taxonomy. *Proc R Soc Lond* 1, 286-297.
- McLachlan RI, 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14, 345-362.
- McNabb FMA, 1992. Thyroid hormones. Englewood Cliffs, Prentice Hall, pp 283.
- Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z, 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp Biochem Physiol* 119, 325-338.
- Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A, Schultz RW, and Yaron Z, 2000. Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *O. Aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GtH) I and II subunits. *J Exp Zool* 286, 64-75.
- Melià P, Bevacqua D, Crivelli AJ, De Leo GA, Panfili J, Gatto M, 2006. Age and growth of *Anguilla anguilla* in the Camargue lagoons. *J Fish Biol* 68, 876-890.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F, 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 66, 1881-1892.
- Meriggiola MC, Dahl KD, Mather JP, Bremmer WJ, 1994. Follistatin decreases activin-stimulated FSH secretion with no effect on GnRH-stimulated FSH secretion in prepubertal male monkeys. *Endocrinology* 134, 1967-1970.
- Mermillod P, 2001. Croissance et maturation de l'ovocyte *in vivo* et *in vitro*. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme" (eds Thibault C, Levasseur MC), Paris, INRA Editions, pp 348-366.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Tresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge MH, Caraty A, Aparicio SA, 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1761-1766.
- Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W, 1988. Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A, and β B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 247-251.
- Michel U, Albiston A, Findlay JK, 1990. Rat follistatin: gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 401-407.
- Miki M, Shimotani T, Nozaki M, 2005. Distribution of immunoreactivities for adenohipophysial hormones in the pituitary gland of the polypteriform fish, *Polypterus endlicheri*. *Zool Sci* 22, 1123-1130.
- Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR, 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25, 235-275.
- Miranda LA, Strüssmann CA, Somoza GM, 2001. Immunocytochemical identification of GtH1 and GtH2 cells during the temperature-sensitive period for sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Gen Comp Endocrinol* 124, 45-52.
- Mitsuhashi E, Saito K, Matsubara H, Hirai T, Adachi S, Yamauchi K, 2000. Effects of sex steroids on FSHb and LHb mRNA levels in cultured pituitary of Japanese eel. *Proc Jpn Soc Comp Endocrinol* 15, 14.
- Miura T, Yamauchi K, Nagahama Y, Takahashi H, 1991a. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool Sci* 8, 63-73.

- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y, 1991b. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Dev Biol* 146, 258-262.
- Miura C, Miura T, Kudo N, Yamashita M, Yamauchi K, 1999. cDNA cloning of a stage-specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev Growth Differ* 41, 463-71.
- Miwa S, Inui Y, 1985. Effects of L-thyroxine and ovine growth hormone on smoltification of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Gen Comp Endocrinol* 58, 436-442.
- Miwa S, Inui Y, 1986. Inhibitory effect of 17 α -methyltestosterone and estradiol 17 β on smoltification of sterilized amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture* 53, 21-39.
- Miwa S, Inui Y, 1987a. Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 67, 356-363.
- Miwa S, Inui Y, 1987b. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus*. *Cell Tissue Res* 249, 117-123.
- Miwa S, Inui Y, 1991. Thyroid hormone stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder. *J Exp Zool* 259, 222-228.
- Miwa S, Tagawa M, Inui Y, Hirano T, 1988. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae. *Gen Comp Endocrinol* 70, 158-163.
- Miwa S, Yamano K, Inui Y, 1992. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. *J Exp Zool* 261, 424-430.
- Miwa S, Yan L, Swanson P, 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography. *Biol Reprod* 50, 629-642.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. 1985. Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem Biophys Res Commun* 129, 396-403.
- Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA, 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J Mol Endocrinol* 38, 235-244.
- Moncaut N, Somoza G, Power DM, Canario AV, 2005. Five gonadotropin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. *J Mol Endocrinol* 34, 767-779.
- Montero M, Vidal B, King JA, Tramu G, Vandesande F, Dufour S, Kah O, 1994. Immunocytochemical localization of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *J Chem Neuroanat* 7, 227-241.
- Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP, Dufour S, 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61, 525-535.
- Montero M, Le Belle N, Vidal B, Dufour S, 1996. Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *Gen Comp Endocrinol* 104, 103-115.
- Moore JP Jr, Wilson L, Dalkin AC, Winters SJ, 2003. Differential expression of the pituitary gonadotropin subunit genes during male rat sexual maturation: reciprocal relationship between hypothalamic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and follicle-stimulating hormone beta expression. *Biol Reprod* 69, 234-241.

Morley JE, 1981. Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocrine Rev* 2, 396-436.

Mousa MA, Mousa SA, 2003. Immunohistochemical localization of inhibin and activin-like proteins in the brain, pituitary gland, and the ovary of thin-lipped grey mullet, *Liza ramada* (Risso). *Gen Comp Endocrinol* 132, 434-443.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC, 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276, 28969-75.

Munakata A, Amano M, Ikuta K, Kitamura S, Aida K, 2001. The involvement of sex steroid hormones in downstream and upstream migratory behavior of masu salmon. *Comp Biochem Physiol* 129B, 661-669.

Murr E, Sklower A, 1928. Untersuchungen über die inkretorischen Organe der Fische. I. Das Verhalten der Schilddrüse in der Metamorphose des Aales. *Zeitschr Vergleichende Physiol* 7, 279-288.

Muske LE, 1993. Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav Evol* 42, 215-230.

Muttukrishna S, Knight PG, 1991. Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J Mol Endocrinol* 6, 171-178.

N

Nagae M, Adachi S, Yamauchi K, 1996. Changes in transcription of pituitary glycoprotein hormone and gonadotropin II β subunits during ovarian development induced by repeated injections of salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17, 179-186.

Nagae M, Todo T, Gen K, Kato Y, Young G, Adachi S, Yamauchi K, 1996a. Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone α - and gonadotropin II β -subunits of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate. *J Mol Endocrinol* 16, 171-181.

Nagae M, Todo T, Gen K, Kato Y, Young G, Adachi S, Yamauchi K, 1996b. Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone - and gonadotropin II β subunits of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate. *J Mol Endocrinol* 16, 171-181.

Nagae M, Adachi S, Yamauchi K, 1997. Changes in transcription of pituitary glycoprotein hormones α and gonadotropin II β subunits during ovarian development induced by repeated injections of salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17, 179-186.

Nagahama Y, 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 38, 217-229.

Nagahama Y, 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of the gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In « Proceedings of the 6th International Symp on Reprod Physio of Fish » (eds Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO), Bergen, pp. 211-222.

Naito N, Hyodo S, Okumoto N, Urano A, Nakai Y, 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell Tissue Res* 266, 457-467.

Naito N, de Jesus EG, Nakai Y, Hirano T, 1993. Ontogeny of pituitary cell-types and the hypothalamo-hypophysial relationship during early development of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Cell Tissue Res* 272, 429-437.

Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H, 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247, 836-838.

Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM, 1992. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci* 3, 17-22.

Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A, 2007. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (*drd2*) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *Gen Comp Endocrinol* 150, 278-287.

Norwitz ER, Xu S, Jeong KH, Bedecarrats GY, Winebrenner LD, Chin WW, Kaiser UB, 2002. Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH-receptor gene. *Endocrinology* 143, 985-997.

Nozaki M, Fujita I, Saito N, Tsukahara T, Kobayashi H, Ueda K, Oshima K, 1985. Distribution of LHRH-like immunoreactivity in the brain of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) with special reference to the nervous terminals. *Zool Sci* 2, 537-548.

Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K, Kawauchi H, 1990a. Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins GtHI and GtHII. *Gen Comp Endocrinol* 77, 348-357.

Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K, Kawauchi H, 1990b. Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen Comp Endocrinol* 77, 358-367.

O

Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Yoshikuni M, Kawauchi H, Nagahama Y, 1999a. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 263, 584-590.

Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Yoshikuni M, Kawauchi H, Nagahama Y, 1999b. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 265, 366-371.

Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Kobayashi T, Nagahama Y, 2001. Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 129, 441-448.

Ohta H, Tanaka H, 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 153, 123-134.

Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Inuma N, Hirose K, 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 17, 163-169.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M, 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613-617.

Oka Y, 2002. Physiology and release activity of GnRH neurons. *Prog Brain Res* 141, 259-281.

Okada T, Kawazoe I, Kimura S, Sasamoto Y, Aida K, Kawauchi H, 1994. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int J Pept Protein Res* 43, 69-80.

Okada N, Tanaka M, Tagawa M, 2003. Bone development during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): differential responses to thyroid hormone. In "The Big Fish Bang". Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference (eds Browman HI and Skiftesvik AB). Bergen, Norway Publisher, 11 p.

- Okubo K, Aida K, 2001. Gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in a primitive teleost, the arowana: phylogenetic evidence that three paralogous lineages of GnRH occurred prior to the emergence of teleosts. *Gen Comp Endocrinol* 124, 125-133.
- Okubo K, Suetake H, Aida K, 1999a. Expression of two gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor genes in various tissues of the Japanese eel and evolution of GnRH. *Zool Sci* 16, 471-478.
- Okubo K, Suetake H, Aida K, 1999b. A splicing variant for the prepro-mammalian gonadotropin-releasing hormone (prepro-mGnRH) mRNA is present in the brain and various peripheral tissues of the Japanese eel. *Zool Sci* 16, 645-651.
- Okubo K, Suetake H, Usami T, Aida K, 2000. Molecular cloning and tissue-specific expression of a gonadotropin-releasing hormone receptor in the Japanese eel. *Gen Comp Endocrinol* 119, 181-192.
- Okubo K, Nagata S, Ko R, Kataoka H, Yoshiura Y, Mitani H, Kondo M, Naruse K, Shima A, Aida K, 2001. Identification and characterization of two distinct gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes in a teleost, the medaka *Oryzias latipes*. *Endocrinology* 142, 4729-4739.
- Okubo K, Suetake H, Aida K, 2002. Three mRNA species for mammalian-type gonadotropin-releasing hormone in the brain of the eel *Anguilla japonica*. *Mol Cell Endocrinol* 192, 17-25.
- Okubo K, Ishii S, Ishida J, Mitani H, Naruse K, Kondo M, Shima A, Tanaka M, Asakawa S, Shimizu N, Aida K, 2003. A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314, 121-131.
- Okuzawa K, 2002. Puberty in teleosts. *Fish Physiol Biochem* 26, 31-41.
- Olivereau M, Chambolle P, 1978. Ultrastructure of gonadotropic cells of the normal eel and after estradiol injection. *C R Acad Sci D* 287, 1409-1412.
- Olivereau M, Nagahama Y, 1982. Immunocytochemical study of eel and trout gonadotropes. *Gen Comp Endocrinol* 46, 365-366.
- Olivereau M, Olivereau J, 1979a. Effect of estradiol-17 β on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. *Cell Tissue Res* 199, 431-454.
- Olivereau M, Olivereau J, 1979b. Estradiol-positive feedback on gonadotropic (GTH) cells in freshwater male silver eels. *Gen Comp Endocrinol* 39, 247-261.
- Olivereau M, Olivereau J, 1985. Effects of 17 -methyltestosterone on the skin and gonads of freshwater male silver eels. *Gen Comp Endocrinol* 57, 64-71.
- O'Neill DF, Powell JF, Standen EM, Youson JH, Warby CM, Sherwood NM, 1998. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonytongue fishes: putative origin of salmon GnRH. *Gen Comp Endocrinol* 112, 415-425.
- Oppen-Berntsen DO, Olsen SO, Rong CJ, Taranger GL, Swanson P, Walther BT, 1994. Plasma levels of eggshell Zr-proteins, estradiol-17 β , and gonadotropins during an annual reproductive cycle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Zool* 268, 59-70.
- Otake T, 2003. Metamorphosis. In "Eel Biology" (eds Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K) Tokyo, Springer, pp 61-74.
- Otsuka S, 1956. The extraction and bioassay of the follicle-stimulating and luteinizing substances of the salmon. *Endocrinol Japon* 3, 272-279.

P

- Pankhurst NW, 1982a. Changes in the skin-scale complex with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). J Fish Biol 21, 549-561.
- Pankhurst NW, 1982b. Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). J Fish Biol 21, 127-140.
- Pankhurst NW, 1982c. Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). J Fish Biol 21, 417-428.
- Pankhurst NW, Lythgoe JN, 1982. Structure and color of the tegument of the European eel *Anguilla anguilla* (L.). J Fish Biol 21, 279-296.
- Pankhurst NW, Lythgoe JN, 1983. Changes in vision and olfaction during sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). J Fish Biol 23, 229-240.
- Pankhurst NW, Sorensen PW, 1984. Degeneration of the alimentary tract in sexually maturing European *Anguilla anguilla* (L.) and American eels *Anguilla rostrata* (Le Sueur). Can J Zool 62, 1143-1149.
- Papkoff H, Samy TS, 1967. Isolation and partial characterization of the polypeptide chains of ovine interstitial cell-stimulating hormone. Biochim Biophys Acta 147, 175-177.
- Parhar IS, Soga T, Sakuma Y, 1996. In situ hybridization for two differentially expressed GnRH genes following estrogen and triiodothyronine treatment in the brains of juvenile tilapia (cichlid). Neurosci Lett 218, 135-138.
- Parhar IS, Soga T, Sakuma Y, 2000. Thyroid hormone and estrogen regulate brain region-specific messenger ribonucleic acids encoding three gonadotropin-releasing hormone genes in sexually immature male fish, *Oreochromis niloticus*. Endocrinology 141, 1618-1626.
- Parhar IS, Tosaki H, Sakuma Y, Kobayashi M, 2001. Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. Neuroscience 104, 1099-1110.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y, 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormones types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. Endocrinology 145, 3613-3618.
- Pasmanik M, Callard GV, 1985. Aromatase and 5-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. Gen Comp Endocrinol 60, 244-251.
- Pasqualini C, Vidal B, Le Belle N, Sbaihi M, Weltzien FA, Vernier P, Zohar Y, Dufour S, 2004. Un contre pouvoir au contrôle de la reproduction par la GnRH chez les poissons téléostéens: l'inhibition dopaminergique. Role ancestral et conservation différentielle chez les vertébrés? J Soc Biol 198, 61-67.
- Pawson AJ, Katz A, Sun YM, Lopes J, Illing N, Millar RP, Davidson JS, 1998. Contrasting internalization kinetics of human and chicken gonadotropin-releasing hormone receptors mediated by C-terminal tail. J Endocrinol 56, R9-12.
- Pedersen BH, 2003. Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilization of the eggs. Aquaculture 224, 323-338.
- Pedersen BH, 2004. Fertilization of the eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. Aquaculture 237, 461-473.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O, 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. Gen Comp Endocrinol 142, 60-

66.

Pelletier G, Leclerc R, Labrie F, 1976. Identification of gonadotropic cells in the human pituitary by immunoperoxidase technique. *Mol Cell Endocrinol* 6, 123-128.

Peng C, Mukai ST, 2000. Activins and their receptors in female reproduction. *Biochem Cell Biol.* 78, 261-79.

Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang HJ, Miller WL, Mellon PL, 2001. Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142, 2284-95.

Peter RE, Crim LW, 1978. Hypothalamic lesions of goldfish: effects on gonadal recrudescence and gonadotropin secretion. *Ann Biol anim Bioch Biophys* 18, 819-823.

Peter RE, Paulencu CR, 1980. Involvement of the Preoptic Region in Gonadotropin Release-Inhibition in Goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 3, 133-141.

Peter RE, Crim LW, Goos HJTh, Crim JW, 1978. Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *Gen Comp Endocrinol* 35, 391-401.

Peter RE, Chang JP, Nahorniak CS, Omeljaniuk RJ, Sokolowski M, Shih SH, Billard R, 1986. Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Prog Horm Res* 42, 513-548.

Peter RE, Lin HR, Van Der Kraak G, 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74, 1-10.

Peter RE, Prasada Rao PD, Baby SM, Illing N, Millar RP, 2003. Differential brain distribution of gonadotropin-releasing hormone receptors in the goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 132, 399-408.

Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gerard E, 1997. Investigation into the possible role of androgens in the induction of hepatic vitellogenesis in the European eel: In vivo and in vitro studies. *Fish Physiol Biochem* 16, 107-118.

Peyon P, Zanuy S, Carrillo M, 2001. Action of leptin on in vitro luteinizing hormone release in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 65, 1573-1578.

Phillips D, 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol* 28, 1-16.

Pierce JG, Parsons TF, 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50, 465-495.

Pinelli C, Fiorentino M, D'Aniello B, Tanaka S, Rastogi RK, 1996. Immunohistochemical demonstration of FSH and LH in the pituitary of the developing frog, *Rana esculenta*. *Gen Comp Endocrinol* 104, 189-196.

Pinto PIS, Passos AL, Martins RS, Power DM, Canario AVM, 2006. Characterization of estrogen receptor bb in sea bream (*Sparus auratus*): phylogeny, ligand-binding and comparative analysis of expression. *Gen Comp Endocrinol* 145, 197-207.

Planas JV, Athos J, Goetz FW, Swanson P, 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol Reprod* 62, 1262-1269.

Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Björnsson B Th, Einarsdottir IE, Canario AVM, Sweeney GE, 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp Biochem Physiol* 130C, 447-459.

Pradet-Balade B, 1998. Evolution de la regulation de la fonction thyroïdienne: étude chez les Téléostéens. PhD thesis University Paris XI.

Pradet-Balade B, Schmitz M, Salmon C, Dufour S, Quérat B, 1997. Down-regulation of TSH subunit mRNA levels by thyroid hormones in the European eel. *Gen Comp Endocrinol* 108, 191-198.

Prat F, Sumpter JP, Tyler CR, 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54, 1375-1382.

Premdas FH, Eales JG, 1976. The influence of TSH and ACTH on purine and pteridine deposition in the skin of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Zool* 54, 576-581.

Proudman JA, Vandesande F, Berghman LR, 1999. Immunohistochemical evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone reside in separate cells in the chicken pituitary. *Biol Reprod* 60, 1324-1328.

Q

Quérat B, Hardy A, Leloup-Hatey J, 1985. Niveaux plasmatiques, vitesses de clairance métabolique, et vitesses de sécrétion de la testostérone et de l'oestradiol-17 β chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) argentée. *Gen Comp Endocrinol* 59, 482-493.

Quérat B, Nahoul K, Hardy A, Fontaine YA, Leloup-Hatey J, 1987. Plasma concentrations of ovarian steroids in the freshwater European silver eel (*Anguilla anguilla* L.): effects of hypophysectomy and transfer to sea water. *J. Endocrinol.* 114, 289-294.

Quérat B, Jutisz M, Fontaine YA, Counis R, 1990a. Cloning and sequence analysis of the cDNA for the pituitary glycoprotein hormone α -subunit of the European eel. *Mol Cell Endocrinol* 71, 253-259.

Quérat B, Moumni M, Jutisz M, Fontaine YA, Counis R, 1990b. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative β subunit of the type-II gonadotrophin from European eel. *J Mol Endocrinol* 4, 257-264.

Quérat B, Hardy A, Fontaine YA, 1991. Regulation of the type-II gonadotrophin alpha and beta subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *J Mol Endocrinol* 7, 81-86.

Quérat B, Sellouk A, Salmon C, 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol Reprod* 63, 222-228.

Quérat B, Tonnerre-Doncarli C, Génies F, Salmon C, 2001. Duality of gonadotropins in gnathostomes. *Gen Comp Endocrinol* 124, 308-314.

Quérat B, Arai Y, Henry A, Akama Y, Longhurst TJ, Joss JM, 2004. Pituitary glycoprotein hormone beta subunits in the Australian lungfish and estimation of the relative evolution rate of these subunits within vertebrates. *Biol Reprod* 70, 356-63.

R

Rahman MA, Ohta K, Yamaguchi A, Chuda H, Hirai T, Matsuyama M, 2003. Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. *Fish Physiol Biochem* 28, 81-83.

Ramaley JA, 1976. Effects of corticosterone treatment on puberty in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 153, 514-517.

Rastogi RK, Di Fiore MM, D'Aniello A, Iela L, Fiorentino M, 2002. GnRH in the invertebrates: an overview. *Prog Brain Res* 141, 19-29.

Rebers FEM, Hassing GAM, Zandbergen MA, Goos HJT, Schulz RW, 2000. Regulation of steady-state luteinizing hormone messenger ribonucleic acid levels, de novo synthesis, and release by sex steroids in primary pituitary cell cultures of male African catfish, *Clarias gariepinus*. *Biol Reprod* 62, 864-872.

- Ringstrom SJ, McAndrews JM, Rahal JO, Schwartz NB, 1991. Cortisol in vivo increases FSH beta mRNA selectively in pituitaries of male rats. *Endocrinology* 129, 2793-2795.
- Rivier J, Spiess J, McClintock R, Vaughan J, Vale W, 1985. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 133, 120-7.
- Roberts BL, Meredith GE, Maslam S, 1989. Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Anat Embryol* 180, 401-412.
- Roberts CA, McCutcheon SN, Blair HT, Gluckman PD, Breier BH, 1990. Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-1 concentrations in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 7, 457-463.
- Roberts V, Meunier H, Vaughan J, Rivier J, Rivier C, Vale W, Sawchenko P, 1989. Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 124, 552-554.
- Roberts VJ, Barth SL, Meunier H, Vale W, 1996. Hybridization histochemical and immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits and messenger ribonucleic acids in the rat brain. *J Comp Neurol* 364, 473-493.
- Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MT, Burger HG, Wettenhall RE, de Kretser DM, 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 220-6.
- Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM., 1987. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 744-9.
- Robertson DM, Farnworth PG, Clarke L, Jacobsen J, Cahir NF, Burger HG, de Kretser DM, 1990. Effects of bovine 35 kDa FSH-suppressing protein on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: comparison with bovine 31 kDa inhibin. *J Endocrinol* 124, 417-423.
- Rocha A, Gómez A, Zanuy S, Cerdá-Reverter JM, Carrillo M, 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. *Mol Cell Endocrinol* 272, 63-76.
- Rodaway A, Takeda H, Koshida S, Broadbent J, Price B, Smith JC, Patient R, Holder N, 1999. Induction of the mesendoderm in the zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* 126, 3067-3078.
- Rohr DH, Lokman PM, Davies PS, Young G, 2001. 11-ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla rostrata* (Le Sueur). *J Fish Biol* 32, 297-307.
- Romeo RD, 2003. Puberty : a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. *J Neuroendocrinol* 15, 1185-1192.
- Rosenblum PM, Goos HJTh, Peter RE, 1994. Regional distribution and *in vitro* secretion of salmon and chicken II gonadotropin-releasing hormone from the brain and pituitary of juvenile and adult goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 73, 21-27.
- Rousseau K, Dufour S, 2004. Phylogenetic evolution of the neuroendocrine control of growth hormone: contribution from teleosts. *Cybiurn* 28, 181-198.
- Rousseau K, Huang YS, Le Belle N, Vidal B, Marchelidon J, Epelbaum J, Dufour S, 1998. Long-term inhibitory effects of somatostatin and insulin-like growth factor 1 on growth hormone release by serum-free primary culture of pituitary cells from European eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 67, 301-309.
- Rousseau K, Le Belle N, Marchelidon J, Dufour S, 1999. Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Neuroendocrinol* 11,

385-392.

Rousseau K, Le Belle N, Pichavant K, Marchelidon J, Chow BKC, Boeuf G, Dufour S, 2001. Pituitary growth hormone secretion in turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern neuropeptides. *Neuroendocrinology* 74, 375-385.

Rousseau K, Le Belle N, Sbaihi M, Marchelidon J, Schmitz M, Dufour S, 2002. Evidence for a negative feedback in the control of eel growth hormone by thyroid hormones. *J Endocrinol* 175, 605-613.

S

Saglio P, Escaffre AM, Blanc JM, 1988. Structural characteristics of the epidermal mucosa in yellow and silver European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 32, 505-514.

Saito K, Lokman PM, Young G, Ozaki Y, Matsubara H, Okumura H, Kazeto Y, Yoshiura Y, Aida K, Adachi S, Yamauchi K, 2003a. Follicle-stimulating hormone β , luteinizing hormone β and glycoprotein hormone subunit mRNA levels in artificially maturing Japanese eel *Anguilla japonica* and naturally maturing New Zealand longfinned eel *Anguilla dieffenbachii*. *Fish Sci* 69, 146-153.

Saito K, Chida Y, Adachi S, Yamauchi K, 2003b. In vitro induction of luteinizing hormone synthesis by estrogen in organ-cultured pituitary glands of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zoolog Sci* 20, 69-73.

Saligaut C, Linard B, Breton B, Anglade I, Bailhache T, Kah O, Jegou P, 1999. Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture* 177, 13-20.

Salmon C, Kagawa H, Adachi S, Nagahama Y, Fontaine YA, 1984. Mise en évidence de sites de liaison spécifique pour la gonadotropine de saumon chum (*Oncorhynchus keta*) dans des préparations membranaires de granulosa d'ovaire du saumon amago (*Oncorhynchus rhodurus*). *C R Acad Sci (Paris) Ser III* 298, 337-340.

Salmon C, Miyashita Y, Marchelidon J, Fontaine YA, 1987. Mise en évidence et propriétés des sites de liaison spécifique pour la gonadotropine de carpe dans des préparations membranaires d'ovaire d'anguille (*Anguilla anguilla* L.). *Gen Comp Endocrinol* 65, 203-211.

Salmon C, Marchelidon J, Fontaine YA, Huet JC, Quérat B, 1993. Cloning and sequence of thyrotropin beta subunit of a teleost fish: the eel (*Anguilla anguilla* L.). *C R Acad Sci III*. 316, 749-53.

Sambroni E, Le Gac F, Breton B, Lareyre JJ, 2007. Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. *J Endocrinol* 195, 213-228.

Sato N, Kawazoe I, Suzuki Y, Aida K, 1996. Use of an emulsion prepared with lipophilized gelatine for the induction of ovarian maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 62, 806-814.

Sbaihi M, 2001. Interaction des stéroïdes sexuels et du cortisol dans le contrôle de la reproduction et du métabolisme calcique chez un téléostéen migrateur, l'anguille (*Anguilla anguilla*). PhD thesis University Paris VI.

Sbaihi M, Fouchereau-Peron M, Meunier F, Elie P, Mayer I, Burzawa-Gerard E, Vidal B, Dufour S, 2001. Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the European eel. *J Fish Biol* 59, 302-318.

Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF, 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173, 1036-1038.

Schmidt J, 1909. Remarks on the metamorphosis and distribution of the larvae of the eel. *Meddelelser fra Kommissionen for Havundersogelser. Fiskeri* 3, 1-17.

Schmidt J, 1922. The breeding places of the eel. *Phil Trans R Soc London* 211, 179-208.

- Schmidt J, 1923. Breeding places and migration of the eel. *Nature* 111, 51-54.
- Scholz AT, 1980. Hormonal regulation of smolt transformation and olfactory imprinting in coho salmon. PhD thesis, University of Wisconsin, Madison.
- Schreiber AM, 2001. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. *Comp Biochem Physiol* 129B, 587-595.
- Schreiber AM, Specker JL, 2000. Metamorphosis in the summer flounder, *Paralichthys dentatus*: thyroidal status influences gill mitochondria-rich cells. *Gen Comp Endocrinol* 117, 238-250.
- Schreibman MP, Margolis-Nunno H, Halpern-Sebold L, Goos HJT, Perlman PW, 1986. The influence of androgen administration on the structure and function of brain-pituitary-gonad axis of sexually immature platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cell Tissue Res* 245, 519-524.
- Schultz R, Schlaghecke R, Blum V, 1985. A particulate membrane preparation from ovaries of preovulatory rainbow trout (*Salmo gairdnerii*): binding studies with ¹²⁵I-human chorionic gonadotropin. *Comp Biochem Physiol A* 82, 429-433.
- Schulz RW, Bosma PT, Zandbergen MA, Van Der Sanden MCA, Van Dijk W, Peute J, Bogerd J, Goos HJTh, 1993. Two gonadotropin releasing hormones in the African catfish *Clarias gariepinus*: localization, pituitary receptor binding and gonadotropin release activity. *Endocrinology* 133, 1569-1577.
- Schultz RW, Bogerd J, Bosma PT, Peute J, Rebers FEM, Zandbergen MA, Goos HJth, 1995. Physiological, morphological and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. In "Reproductive physiology of fish" (eds Goetz FW, Thomas P) Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of fish, Austin, Texas, pp 2-6.
- Sébert ME, Amérand A, Vettier A, Weltzien FA, Pasqualini C, Sébert P, Dufour S, 2007. Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary-gonad axis in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Gen Comp Endocrinol* 153, 289-298.
- Sébert P, 2003. Fish adaptations to pressure. In "Fish adaptation" (eds Val AL, Kapoor BG) Science Publishers, Enfield, pp 73-95.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH, 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349, 1614-1627.
- Senthilkumaran B, Joy KP, 1996. Effects of administration of some monoamine-synthesis blockers and precursors on ovariectomy-induced rise in plasma gonadotropin II in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Gen Comp Endocrinol* 101, 220-226.
- Shi YB, 1999. Amphibian metamorphosis. From Morphology to Molecular Biology. John Wiley, New York.
- Shimizu A, Tanaka H, Kagawa H, 2003. Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. *Gen Comp Endocrinol* 132, 35-45.
- Shukovski L, Findlay JK, Robertson DM, 1991. The effect of follicle-stimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells *in vitro* and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology* 129, 3395-3402.
- Sinha VPR, Jones JW, 1975. The European freshwater eel. Liverpool University Press, Liverpool.

- Slater CH, Schreck CB, Swanson P, 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol* 109A, 167-175.
- Smeets WJ, González A, 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res* 33, 308-379.
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA, 2006. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18, 298-303.
- So WK, Kwok HF, Ge W, 2005. Zebrafish Gonadotropins and Their Receptors: II. Cloning and Characterization of Zebrafish Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Subunits— Their Spatial-Temporal Expression Patterns and Receptor Specificity. *Biol Reprod* 72, 1382–1396.
- Soffientino B, Specker JL, 2001. Metamorphosis of summer flounder, *Paralichthys dentatus*: cell proliferation and differentiation of the gastric mucosa and developmental effects of altered thyroidal status. *J Exp Zool* 290, 31-40.
- Soga T, Ogawa S, Millar RP, Sakuma Y, Parhar IS, 2005. Localization of the three GnRH types and GnRH receptors in the brain of a cichlid fish: insights into their neuroendocrine and neuromodulator functions. *J Comp Neurol* 487, 28-41.
- Sohn YC, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K, 1998. Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunits in the goldfish *Carassius auratus*. *Fish Sci* 64, 715-721.
- Sohn YC, Kobayashi M, Aida K, 1999. Differential expression and structure of the goldfish FSHB (GTH-I β) and LHB (GTH-II β) genes. In “ Proceedings of the 6th international Symp. on the Repro. Physiol. of Fish” (eds Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson S O), Bergen, pp. 469-471.
- Sohn YC, Kobayashi M, Aida K, 2001. Regulation of gonadotropin β subunit gene expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol* 129B, 419-426.
- Solbakken JS, Norberg B, Watanabe K, Pittman K, 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Env Biol Fish* 1-2, 53-65.
- Somoza GM, Lescheid DW, Miranda LA, Lo Nostro FL, Magliulo-Cepriano L, Montaner AD, Schreiber MP, Rivier JE, Sherwood NM, 2002. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three orders of fish. *Biol Reprod* 67, 1864-1871.
- Sorensen PW, Winn HE, 1984. The induction of maturation and ovulation in American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur), and the relevance of chemical and visual cues to male spawning behaviour. *J Fish Biol* 25, 261-268.
- Sorensen PW, Pankhurst NW, 1988. Histological changes in the gonad, skin, intestine and olfactory epithelium of artificially-matured male American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur). *J Fish Biol* 32, 297-307.
- Staley KB, Ewing RD, 1992. Purine levels in the skin of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during parr-smolt transformation and adaptation to seawater. *Comp Biochem Physiol* 101B, 447-452.
- Sterba G, 1953. Die physiologie und histogenese der schildrtlse und des thymus beim bachneunague (*Lampetra planeri* Boch = *Petromyzon planeri* Boch) als grundlagen phylogenetischer studien tiber die evolution der innersekretorischen kiemendarmderivate nebst einigen mitteilugen über die bionomie der bachneunaugen und morphologische-physiologischen untersuchungen fiber den, Kiel endarm. *Wiss Z Friedrich-Schiller-Univ. Jena Math.-Naturwiss. Reihe 3:H2*, 239-298.
- Sterba G, Schneider J, 1961. Zur Wirkung von Kalium-perchlorat (KClO₄) auf Ammocoeten. *Naturwissenschaften* 48, 485-486.

- Stockell-Hartree A, Cunningham FJ, 1969. Purification of chicken pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *J Endocrinol* 43, 609–616.
- Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ, 1994. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 15, 462-499.
- Stone R, 2003. Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* 302, 221-222.
- Suetake H, Okubo K, Sato N, Yoshiura Y, Suzuki Y, Aida K, 2002. Differential expression of two gonadotrin (GTH) β subunit genes during ovarian maturation induced by repeated injection of salmon GTH in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 68, 290-298.
- Sullivan CV, Darling DS, Dickhoff WW, 1987. Effects of triiodothyronine and propylthiouracil on thyroid function and smoltification of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol Biochem* 4, 121-135.
- Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK, 2003. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Mol Endocrinol* 17, 318-32.
- Suter DE, Schwartz NB, 1985a. Effects of glucocorticoids on secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by female rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 117, 849-854.
- Suter DE, Schwartz NB, 1985b. Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone by male rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 117, 855-859.
- Suter DE, Schwartz NB, Ringstrom SJ, 1988. Dual role of glucocorticoids in regulation of pituitary content and secretion of gonadotropins. *Am J Physiol* 254, E595-600
- Suzuki S, 1986. Induction of metamorphosis and thyroid function in the larval lamprey. In “Frontiers in thyroidology” (eds, Medeiros-Neto G, Gaitan E). Plenum, New York pp. 667-670.
- Suzuki K, Kanamori A, Kawauchi H, Nagahama Y, 1988. Development of salmon GTH-I and GTH-II radioimmunoassay. *Gen Comp Endocrinol* 71, 459-467.
- Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y, 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol* 71, 292-301.
- Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y, 1988b. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 71, 302-306.
- Suzuki R, Kishida M, Hirano T, 1990. Growth hormone secretion during longterm incubation of the pituitary of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol Biochem* 8, 159-165.
- Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T, 2008. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 103, 360-365.
- Swanson P, 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In “Proceedings of the 4th international symposium on the reproductive physiology of fish” (eds Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS) Sheffield, pp 2-7.
- Swanson P, Bernard M, Nozaki M, Suzuki H, Kawauchi H, Dickhoff WW, 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol Biochem* 7, 169-176.
- Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW, 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 44, 29-38.

Swerdloff RS, Batt RA, Bray GA, 1976. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 98, 1359-1364.

T

Tada T, Hirono I, Aoki T, Takashima F, 1998. Structure and expression of activin genes in rainbow trout. *Mol Mar Biol Biotechnol* 7, 72-77.

Tada T, Hirono I, Aoki T, Takashima F, 2000. Cloning and sequencing of carp and medaka activin subunit genes. *Fish. Sci.* 64, 680-685.

Tagawa M, Miwa S, Inui Y, de Jesus EG, Hirano T, 1990. Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool Sci* 7, 93-96.

Tanaka H, 2003. Techniques for larval rearing. In "Eel Biology" (eds Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K) Tokyo, Springer, pp 427-434.

Tanaka H, Kagawa H, Okuzawa K, Hirose K, 1993. Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II. *Fish Physiol Biochem* 10, 409-418.

Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, Unuma T, Nomura K, 2003. The first production of glass eel in captivity: Fish reproductive facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol Biochem* 28, 493-497.

Tanaka S, Park MK, Hayashi H, Hanaoka Y, Wakabayashi K, Kurosumi K, 1990. Immunocytochemical localization of the subunits of glycoprotein hormones (LH, FSH, and TSH) in the bullfrog pituitary gland using monoclonal antibodies and polyclonal antiserum. *Gen Comp Endocrinol* 77, 88-97.

Taragnat C, 2001. L'axe hypothalamo-hypophysaire: ontogénèse, morphologie et aspects fonctionnels. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme" (eds Thibault C, Lévassieur MC), Paris, INRA Editions, pp 23-47.

Tata JR, 1998. Hormonal signalling and postembryonic development. Springer, Berlin.

Tata JR, 1999. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental action of thyroid hormone. *Biochimie* 81, 359-366.

Tata JR, 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 246, 10-20.

Tensen C, Okuzawa K, Blomenrohr M, Rebers F, Leurs R, Bogerd J, Schulz R, Goos H, 1997. Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. *Eur J Biochem* 243, 134-140.

Tesch FW, 1977. The eel. In *Biology and management of anguillid eels*, London, Chapman & Hall.

Tesch FW, 1982. The sargasso Sea Eel Expedition 1979. *Helgoländer Meeresunters* 35, 263-277.

Tesch FW, 1989. Changes in swimming depth and direction of silver eels (*Anguilla anguilla* L.) from the continental shelf to the deep sea. *Aquatic Living Resources* 2, 9-20.

Tesch FW, Westerberg H, Karlsson L, 1991. Tracking studies on migrating silver eels in the Central Baltic. *Meeresforschung* 33, 183 -196.

Theron M, Guerrero F, Sébert P, 2000. Improvement in the efficiency of oxidative phosphorylation in the freshwater eel acclimated to 10.1 MPa hydrostatic pressure. *J Exp Biol* 203, 3019-3023.

Thompson AJ, Sargent JR, 1978. Changes in the levels of chloride cells and (Na-K) dependant ATPase in the gills of yellow and silver eels adaptating to seawater. *J Exp Zool* 200, 33-40.

Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR, 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16, 850-858.

Tilbrook AJ, Clarke IJ, de Kretser DM, 1995. Human recombinant follistatin-288 suppresses plasma concentrations of follicle-stimulating hormone but is not a significant regulator of luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod* 53, 1353-1358.

Todd PR, 1979. Hormone-induced maturation of New Zealand freshwater eels. *Rapport et Procès-verbaux Réunions. Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 174, 91-97.

Trinh KY, Wang NC, Hew CL, Crim LW, 1986. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. *Eur J Biochem* 159, 619-624.

Tsai PS, 2006. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen Comp Endocrinol* 148, 48-53.

Tsukamoto K, 1992. Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature* 356, 789-791.

Tucker DW, 1959. A new solution to the Atlantic eel problem. *Nature* 183, 495-501.

Twan WH, Hwang JS, Lee YH, Jeng SR, Yueh WS, Tung YH, Wu HF, Dufour S, Chang CF, 2006. The presence and ancestral role of gonadotropin-releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinology* 147, 397-406.

U

Uchiyama H, Komazaki S, Asashima M, Kikuyama S, 1996. Occurrence of immunoreactive activin/inhibin beta(B) in gonadotrophs, thyrotrophs, and somatotrophs of the *Xenopus* pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 102, 1-10.

Uchiyama H, Koda A, Komazaki S, Oyama M, Kikuyama S, 2000. Occurrence of immunoreactive activin/inhibin beta(B) in thyrotropes and gonadotropes in the bullfrog pituitary: possible paracrine/autocrine effects of activin B on gonadotropin secretion. *Gen Comp Endocrinol* 118, 68-76.

Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R, 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8282-8286.

V

Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J, 1986. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321, 776-779.

Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, 1988. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 44, 1-34.

Van Aerle R, Kille P, Lange A, Tyler CR, 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29, 57-64.

Van Asselt LA, Goos HJ, Smit-van Dijk W, Speetjens PAM, Van Oordt PGWJ, 1988. Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 72, 369-378.

Van Den Thillart G, Van Ginneken V, Körner F, Heijmans R, Van Der Linden R, Gluvers A, 2004. Endurance swimming of European eel. *J Fish Biol* 65, 312-318.

Van der Kraak G, Donaldson EM, Chang JP, 1986. Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin release

in coho salmon. *Can J Zool* 64, 1245-1248.

Van Ginneken V, Van Den Thillart G, 2000. Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403, 156-157.

Van Ginneken V, Antonissen E, Müller UK, Booms R, Eding E, Verreth J, van den Thillart G, 2005. Eel migration to the Sargasso: remarkably high swimming efficiency and low energy costs. *J Exp Biol* 208, 1329-1335.

Van Ginneken V, Durif C, Balm SP, Boot R, Verstegen MWA, Antonissen E, van den Thillart G, 2007. Silvering of European eel (*Anguilla anguilla* L.): seasonal changes of morphological and metabolic parameters. *Anim Biol* 57, 63-77.

Van Ginneken V, Dufour S, Sbaihi M, Balm P, Noorlander K, de Bakker M, Doornbos J, Palstra A, Antonissen E, Mayer I, Van Den Thillart G, 2007. Does a 5500-km swim trial stimulate early sexual maturation in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147, 1095-103.

Van Utrecht WL, Holleboom MA, 1985. Notes on eel larvae (*Anguilla anguilla* L., 1758) from the central and eastern North Atlantic and on glass eels from the European continental shelf. *Bijdragen tot de dierkunde* 55, 249-262.

Vassart G, Pardo L, Costagliola S 2004. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci* 29, 119-126.

Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland NCH, Sbaihi M, Vernier P, Zohar Y, Dufour S, 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel : a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71, 1491-1500.

Vilter V, 1946. Action de la thyroxine sur la métamorphose larvaire de l'Anguille. *CR Soc Biol* 140, 783-785.

Vischer HF, Bogerd J, 2003. Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 68, 262-271.

Vischer HF, Grannem JCM, Linskens MHK, Schultz RW, Bogerd J, 2003. Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J Mol Endocrinol* 31, 133-140.

Vischer HF, Teves ACC, Ackermans JCM, Van Dijk W, Schultz RW, Bogerd J, 2003. Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating hormone β subunit complementary DNA in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod* 68, 1324-1332.

Vollestad LA, 1992. Geographic variation in age and length at metamorphosis of maturing European eel: environmental effects and phenotypic plasticity. *J Anim Ecol* 61, 41-48.

W

Wald G, 1981. Metamorphosis : an overview. In *Metamorphosis, a problem in developmental biology* (eds Gilbert LI, Frieden E) New York, Plenum Press, pp 1-39.

Wang QF, Farnworth PG, Findlay JK, Burger HG, 1990a. Chronic inhibitory effect of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP) or follistatin on activin- and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH synthesis and secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 127, 1385-1393.

Wang QF, Farnworth PG, Burger HG, Findlay JK, 1990b. Acute inhibitory effect of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP) on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion in cultured rat anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 72, 33-42.

Wang CH, Tzeng WN, 2000. The timing of metamorphosis and growth rates of American and European eel leptocephali: A mechanism of larval segregative migration. *Fish Res* 46, 191-205.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG, 2004. Control of follicular growth: local interactions and

nutritional influences. *J Anim Sci* 82, E63-74.

Weil C, Bougoussa-Houadec M, Gallais C, Itoh S, Sekine S, Valotaire Y, 1995. Preliminary evidence suggesting variations of GtH1 and GtH2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 100, 327-333.

Weil C, Carré F, Blaise O, Breton B, Le Bail PY, 1999. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology* 140, 2054-2062.

Weil C, Le Bail PY, Sabin N, Le Gac F, 2003. In vitro action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle. *Gen Comp Endocrinol* 130, 2-12.

Weiss J, Crowley Jr WF, Halvorson LM, Jameson JL, 1993. Perfusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology* 132, 2307-2311.

Weiss J, Harris PE, Halvorson LM, Crowley Jr WF, Jameson JL, 1992. Dynamic regulation of follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels by activin and gonadotropin-releasing hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* 131, 1403-1408.

Weiss J, Guendner MJ, Halvorson LM, Jameson JL, 1995. Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology* 136, 1885-1891.

Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B, 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol A* 137, 447-477.

Weltzien FA, Pasqualini C, Vernier P, Dufour S, 2005. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *Gen Comp Endocrinol* 142, 134-142.

Weltzien FA, Pasqualini C, Sébert ME, Vidal B, Le Belle N, Kah O, Vernier P, Dufour S, 2006. Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147, 2964-2973.

Westin L, 1990. Orientation mechanisms in migrating European silver eel (*Anguilla anguilla*): temperature and olfaction. *Mar Biol* 106, 175 -179.

White BA, Nicoll CS, 1981. Hormonal control of amphibian metamorphosis. In "Metamorphosis" (eds Gilvert LI and Frieden E) Plenum Press, New York, pp 363-396.

Wiersinga WM, Bartalena L, 2002. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 12, 855-860.

Winters S, Moore J, 2004. Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction* 128, 13-23.

Wittbrodt J, Rosa FM, 1994. Disruption of mesoderm and axis formation in fish by ectopic expression of activin variants: the role of maternal activin. *Genes Dev* 8, 1448-1462.

Wood P, Partridge JC, 1993. Opsin substitution induced in retinal rods of the eel (*Anguilla anguilla* L.): a model for G-protein-linked receptors. *Proc R Soc Lond [B]* 254, 227-232.

Wright GM, Youson JH, 1977. Serum thyroxine concentrations in larval and metamorphosing anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *J Exp Zool* 202, 27-32.

Wright ML, Cykowski LG, Lundrigan L, Hemond KL, Kochan DM, Faszewski EE, Anuszewski CM, 1994. Anterior pituitary and adrenal cortical hormones accelerate or inhibit tadpole hindlimb growth and development depending on

stage of spontaneous development or thyroxine concentration in induced metamorphosis. *J Exp Zool* 270, 175-188.

Wu T, Patel H, Mukai S, Melino C, Garg R, Ni X, Chang J, Peng C, 2000. Activin, inhibin, and follistatin in zebrafish ovary: expression and role in oocyte maturation. *Biol Reprod* 62, 1585–1592.

X

Xiao S, Findlay JK, 1991. Interactions between activin and FSH-suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79, 99-107.

Xiao S, Farnworth PG, Findlay JK, 1992a. Interaction between activin and follicle-stimulating hormone-suppressing protein/follistatin in the regulation of basal inhibin production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131, 2365-2370.

Xiao S, Robertson DM, Findlay JK, 1992b. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131, 1009-1016.

Xiong F, Liu D, Elsholtz HP, Hew CL, 1994. The chinook salmon gonadotropin IIB subunit gene contains a strong minimal promoter with a proximal negative element. *Mol Endocrinol* 8, 771-781.

Xiong F, Liu D, Le Drean Y, Elsholtz HP, Hew CL, 1994. Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary GtHII β -subunit gene during salmon maturation. *Mol Endocrinol* 8, 782-793.

Xu J, McKeehan K, Matsuzaki K, McKeehan WL, 1995. Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *J Biol Chem* 270, 6308-6313.

Y

Yacobovitz M, Solomon G, Gusakovskiy EE, Levavi-Sivan B, Gertler A, 2008. Purification and characterization of recombinant pufferfish (*Takifugu rubripes*) leptin. *Gen Comp Endocrinol* 156, 83-90.

Yada T, Urano A, Hirano T, 1991. Growth hormone and prolactin gene expression and release in the pituitary of rainbow trout in serum-free culture. *Endocrinology* 129, 1183-1192.

Yam KM, Yu KL, Ge W, 1999. Cloning and characterisation of goldfish activin betaA subunit. *Gen Comp Endocrinol* 154, 45-54.

Yam KM, Yoshiura Y, Kobayashi M, Ge W, 1999. Recombinant goldfish activin B stimulates gonadotropin-I β but inhibits gonadotropin-II β expression in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 116, 81-89.

Yamamoto K, Yamauchi K, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature* 251, 220 – 222.

Yamamoto N, 2003. Three gonadotropin-releasing hormone neuronal groups with special reference to teleosts. *Anat Sci Int* 78, 139-155.

Yamano K, Tagawa M, De Jesus EG, Hirano T, Miwa S, Inui Y, 1991. Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *J Comp Physiol* 161B, 371-375.

Yamauchi K, Nakamura M, Takahashi H, Takano K, 1976. Cultivation of larvae of Japanese eel. *Nature* 263, 412.

Yamazaki F, Donaldson EM, 1968. The effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on gametogenesis, vitellogenesis and ovulation in hypophysectomized goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 11, 292-299.

Yan L, Swanson P, Dickhoff WW, 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol Reprod* 47, 418-427.

Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Elizur A, 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. *Comp Biochem Physiol B* 129, 489-502.

Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B, 2003. Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol* 225, 131-185.

Yelick PC, Abduljabbar TS, Stashenko P, 1998. zALK-8, a novel type I serine/threonine kinase receptor, is expressed throughout early zebrafish development. *Dev Dyn* 211, 352-361.

Ying SY, 1988. Inhibins, activins, and follistatins : gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9, 267-293.

Yoshiura Y, Kobayashi M, Kato Y, Aida K, 1997. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin beta subunits (GTH-I β and GTH-II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 105, 379-389.

Yoshiura Y, Suetake H, Aida K, 1999. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 144, 121-131.

Young JZ, Bellerby CW, 1935. The response of the lamprey to injection of anterior lobe pituitary extract. *J Exp Biol* 12, 246-253.

Youngson AF, Scott DCB, Johnstone R, Pretswell D, 1985. The thyroid system's role in the downstream migration of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 45, 392-393.

Youson JH, 1980. The morphology and physiology of lamprey metamorphosis. *Can J Fish Aquat Sci* 37, 687-710.

Youson JH, 1988. First metamorphosis. *In* *Fish Physiology Vol XI, Physiology of developing fish. Part B, Viviparity and posthatching juveniles* (Hoar WS and Randall DJ, eds). Academic Press: San Diego pp. 135-196.

Youson JH, 1997. Is lamprey metamorphosis regulated by thyroid hormones? *Amer Zool* 37, 441-460.

Yu KL, Peter RE, 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 85, 138-146.

Yuen CW, Ge W, 2004. Follistatin suppresses FSH but increases LH expression in the goldfish-evidence for an activin-mediated autocrine/paracrine system in fish pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 135, 108-115.

Yumoto S, Suetake H, Suzuki Y, Nakamura O, Watanabe T, 2001. Expression of GnRH and GnRH receptor genes in fugu *Takifugu rubripes*. *Proc Jpn Soc Comp Endocrinol* 16, 20.

Z

Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK, Brann DW, 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65, 223-228.

Zohar Y, Harel M, Hassin S, Tandler A, 1995. Broodstock management and manipulation of spawning in the githead seabream, *Sparus aurata*. *In* "Broodstock management of egg and larval quality" (eds Bromage N, Roberts RJ) London, Blackwell Science Press, 94-117.

Régulation différentielle de l'expression des gonadotropines (LH et FSH) chez l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*

L'anguille a un cycle de vie complexe avec une reproduction océanique et une croissance dans les eaux continentales. La phase de croissance se termine par une « métamorphose secondaire » ou argenture, dernier stade accessible dans les conditions naturelles. La maturation sexuelle naturelle n'a encore jamais été observée et le développement des gonades reste bloqué du fait d'un déficit en hormones gonadotropes, LH et FSH. Comprendre les mécanismes de régulation de LH et FSH chez l'anguille présente un intérêt fondamental pour l'évolution du contrôle de la puberté et un enjeu appliqué pour la maîtrise de la reproduction chez cette espèce en danger.

Après avoir développé les outils moléculaires pour l'étude de l'expression des sous-unités de LH et FSH, nous montrons qu'au cours de l'argenture seul l'axe gonadotrope est activé, avec une augmentation de l'expression de FSH β puis de LH β , sans activation des axes thyroïdienne et somatotrope, ce qui apparente l'argenture à une puberté plutôt qu'à une métamorphose. Nous observons aussi une régulation différentielle de l'expression de LH β et FSH β au cours de la maturation sexuelle expérimentale avec une amplification sélective de l'expression de LH β .

Grâce à l'utilisation de culture primaire de cellules hypophysaires d'anguille, nous montrons que les stéroïdes sexuels (estradiol et androgènes), les peptides gonadiques (activine/follistatine) et les facteurs métaboliques (IGF-1, certisol) exercent des effets directs sur l'expression de LH β et FSH β et peuvent être impliqués dans leur régulation différentielle.

Mots clés : anguille, téléostéen, reproduction, argenture, puberté, maturation expérimentale, stéroïdes sexuels, activine, certisol, IGF-1, gonadotropines

Differential regulation of gonadotropin expression (LH and FSH) in European eel, *Anguilla anguilla*

The eel has a complex life cycle with an oceanic reproduction phase and a growth phase in continental waters. The growth phase ends with a « secondary metamorphosis » or silvering. This is the last stage in the eel's life cycle which is accessible in natural conditions. Natural sexual maturation has never before been observed and the development of the gonads stays blocked because of a deficit in the gonadotropins LH and FSH. Understanding the regulation mechanisms of eel LH and FSH is of fundamental interest for the development of eel pubertal control and a challenge which must be overcome in order to succeed in regulating the reproduction of this endangered species.

After the development of molecular tools we have studied the LH and FSH subunits; this shows that only the gonadotrophic axis is active during silvering. An increase in FSH β then in LH β was seen without any activation of the thyrotrophic or somatotrophic axes, meaning that silvering is a pubertal event rather than a metamorphosis. There was also observed a differential regulation of expression of LH β and FSH β during experimental sexual maturation with a selective amplification of LH β .

Thanks to the use of primary cell cultures of eel pituitary glands we can show that sex steroids (estradiol and androgens); gonadal peptides (activin/follistatin) and metabolic factors (IGF-I and certisol) exert direct effects on the expression of LH β and FSH β and could be involved in the differential regulation of gonadotropins.

Key words : eel, teleost, reproduction, silvering, puberty, experimental maturation, sexual steroids, activin, certisol, IGF-1, gonadotropins