

identically as absolute values. The mean deviation calculated from these 10 readings of the photo-orientation angle served as a measure for the degree of average photonegativity of the larvae at that hour. Thus, the increase in mean deviation indicated the decrease in photonegativity and vice versa. Variations in the degree of photonegativity were calculated every 2 h for 24 h in a) freshly hatched larvae, b) 24-day-old larvae and c) 40-day-old larvae which were about to pupate. Investigations were carried out separately for larvae reared in constant darkness and for those reared in constant light. Each larva was used only once during the course of these experiments.

The results are shown in Figures 1 and 2. Freshly hatched larvae from a culture in constant darkness showed a marked decrease in photonegativity during the mid-day and mid-night hours and also to some extent around sunrise (Figure 1a). With the increase in

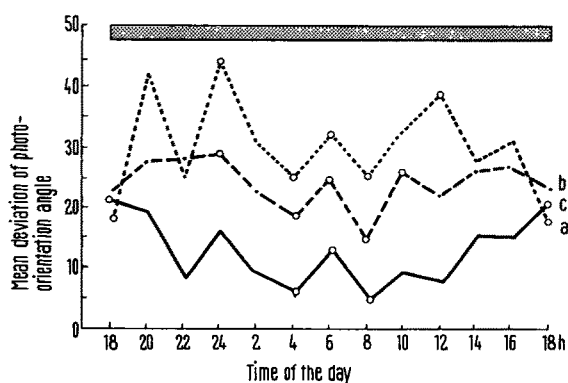


Fig. 1. Variations in photonegativity during 24 h in larvae reared in constant darkness. Larvae: a) freshly hatched, b) 24-day-old and c) 40-day-old. The peaks and troughs indicated by circles were found to be significant by calculating standard errors.

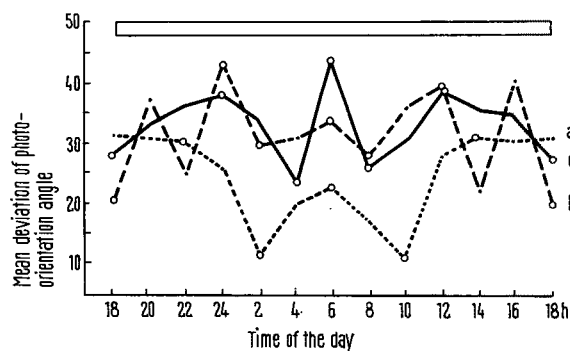


Fig. 2. Variations in photonegativity during 24 h in larvae reared in constant light. Larvae: a) freshly hatched, b) 24-day-old and c) 40-day-old. The peaks and troughs indicated by circles were found to be significant by calculating standard errors.

the age of the larvae, a change was observed in the general pattern of photo-orientation (Figures 1b and 1c). A continuous period of lower photonegativity now extended from mid-day to mid-night with a peak at sunset. In general, there was a progressive repulsion to light with the increasing age of the larvae.

Freshly hatched larvae from constant light conditions showed a pronounced and continuous period of lower photonegativity from mid-day to mid-night hours and also for a few hours around sunrise (Figure 2a). After a change in this photo-orientation pattern with age (Figures 2b and 2c), at 40 days, just before pupation, the previously uninterrupted period of lower photonegativity extending from mid-day to mid-night split into two separate periods by a trough around sunset. It was further noted that the repulsion to light decreased with age in these larvae.

Phototaxis is common in insects which may try to keep a light source at a fixed angle to their side (BIRUKOW^{1,2}, TENCKHOFF-EIKMANN³ and BRANDT⁴). From the present studies, it is evident that the larvae of *G. mellonella* show 24-h patterns of phototactic behaviour. These patterns are undoubtedly influenced by the age of the larvae and the lighting conditions to which they are subjected during development. Further, rearing in constant darkness and constant light have affected the phototactic behaviour of the larvae differently, the two effects bearing a reciprocal relation to each other. The biological explanation for this must be sought in the behaviour of these larvae in their natural biotope. The presence of an endogenous phototactic rhythm pointing to a spontaneously working bio-oscillator (HARKER⁵ and SOLLBERGER⁶) is suspected in view of constancy of some peaks in the curves.

Zusammenfassung. Larven von *G. mellonella* sind negativ phototaktisch. Der Grad der Photonegativität verändert sich während 24 h. Durch Dauerdunkel und Dauerlicht wird das phototaktische Verhalten der Larven reziprok verändert. Wahrscheinlich handelt es sich um eine endogene Photoorientierungsrhythmik.

V. G. VAIDYA^{7,8}

Zoological Institute of the University,
D-34 Göttingen (West Germany), 31 March 1970.

¹ G. BIRUKOW, *Naturwissenschaften* 40, 611 (1953).

² G. BIRUKOW, *Z. vergl. Physiol.* 36, 176 (1954).

³ I. TENCKHOFF-EIKMANN, *Zool. Beitr.* 4, 307 (1959).

⁴ W. H. BRANDT, *Z. vergl. Physiol.* 24, 188 (1936).

⁵ J. E. HARKER, *Biol. Rev.* 33, 1 (1958).

⁶ A. SOLLBERGER, *Biological Rhythm Research* (Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York 1965).

⁷ I am grateful to Prof. Dr. G. BIRUKOW for extending all the facilities for this work and for his kind advice. I am also indebted to the Alexander-von-Humboldt-Stiftung for award of post-doctoral fellowship.

⁸ Present address: Department of Zoology, University of Poona, Poona 7 (India).

Action diurétique et natriurique du Chlorpropamide chez le Rat. Comparaison avec le Tolbutamide

L'effet rénal du Chlorpropamide n'a été étudié qu'à partir du moment où l'on mit en évidence, de façon tout à fait fortuite, son action antidiurétique dans le diabète insipide de l'Homme¹. Depuis, son action substitutive a été largement employée avec succès en clinique et les

rapports sur son activité thérapeutique se sont multipliés²⁻⁶.

L'expérimentation, soit sur organe isolé⁷⁻⁹, soit sur l'animal entier¹⁰⁻¹³ a essayé de faire connaître son mécanisme d'action. C'est également ce que nous avons entre-

pris sur le Rat anesthésié à l'éthanol qui est le réactif biologique de choix pour le dosage de l'hormone anti-diurétique. Nous avons comparé son effet rénal à celui d'une autre sulfonurée: le Tolbutamide et à celui d'un diurétique: le Polythiazide.

Matériel et méthodes. La technique utilisée est celle couramment employée pour le dosage de l'hormone anti-diurétique¹⁴: rats Sprague-Dawley mâles pesant entre 220 et 240 g, anesthésiés à l'éthanol et en surcharge hydrique (10% du poids corporel), ce qui, en principe, met l'animal en état de diabète insipide fonctionnel.

La diurèse est enregistrée par un compte-gouttes associé à un totalisateur avec retour au zéro toutes les minutes (Figures 1 et 2). La conductivité urinaire est aussi enregistrée (matériel Devices). Le sodium et le potassium urinaires sont dosés par photométrie de flamme.

Les injections des 2 sulfonurées ont été faites par voie i.v. dans une solution de soude à pH 8,5, sous un volume de 0,05; 0,1 et 0,2 ml correspondant à 5, 10 et 20 mg de produit pour chaque animal. Enfin, la pression artérielle a été enregistrée et le glucose dosé par une méthode enzymatique à la glucose oxydase.

Résultats. Les tableaux I et II résument les données recueillies pour le Chlorpropamide et le Tolbutamide. Les résultats concernant le Polythiazide n'ont pas été fournis puisque son effet diurétique et natriurique est parfaitement connu.

Pendant les périodes de mesures nous nous sommes assurés que la glycémie n'avait pas variée (les sulfonurées n'ont pas encore eu le temps d'agir), de même que la pression artérielle. Une solution de soude à pH 8,5 n'a eu aucun effet sur les paramètres étudiés.

Discussion. L'analyse de variance des résultats du Chlorpropamide pour les 3 paramètres permet 2 constatations: 1. il existe un effet-dose très important et

hautement significatif ($p \leq 0,01$), 2. il existe un effet-rat hautement significatif pour la diurèse et le potassium, significatif pour le sodium et cela tient aux variations individuelles de l'élimination des électrolytes qui sont connues.

En ce qui concerne l'analyse par covariance, toujours pour le Chlorpropamide, on observe, pour la diurèse, un effet-dose hautement significatif. La réponse à 5 mg est liée linéairement aux valeurs témoins ($r = 0,8$; $p < 0,02$). Par contre, l'effet des doses 10 et 20 mg ne dépend pas des valeurs témoins ($r = 0,45$ pour 10 mg; $r = 0,35$ pour 20 mg).

¹ F. ARDUINO, F. P. J. FERRAZ et J. RODRIGUEZ, *J. clin. Endocr.* 26, 1325 (1966).

² J. REFORZO-MEMBRIVES, L. I. MOLEDO, A. E. LANARO et A. MEGIAS, *J. clin. Endocr.* 28, 332 (1968).

³ D. ANDREANI, G. A. CINOTTI et G. STIRATI, *Metabolism* 18, 874 (1969).

⁴ H. BRICAIRE, H. SALTIEL, G. SCHAISON et J. C. VALCKE, *Ann. Endocr.* 30, 61 (1969).

⁵ R. H. KUNSTADTER, E. C. CABANA et W. OH, *Am. J. Dis. Child.* 117, 436 (1969).

⁶ G. SCHAISON et GILBERT-DREYFUS, *Presse méd.* 78, 101 (1970).

⁷ R. M. HAYS et J. R. INGELFINGER, *J. clin. Invest.* 48, 37a (1969).

⁸ J. R. INGELFINGER et R. M. HAYS, *J. clin. Endocr.* 29, 738 (1969).

⁹ S. A. MENDOZA, *Endocrinology* 84, 411 (1969).

¹⁰ A. G. HOCKEN et D. LONGSON, *Br. med. J.* 57, 355 (1968).

¹¹ M. MILLER et A. M. MOSES, *J. clin. Endocr.* 30, 488 (1970).

¹² J. P. RADO, L. BORDELY, L. SZENDE et J. TAKO, *Pharmacology* 3, 122 (1970).

¹³ J. TOURNIAIRE, CL. GHARIB, J. SASSARD, B. DELBARRE et B. MAZENDO, *Ann. Endocr.*, sous presse (1970).

¹⁴ CL. GHARIB, A. BERTHELON, J. SASSARD et J. DUTRUGE, *Vasopressine et Hypervasopressinismes réactionnels* (Ed. Thomas, Nancy 1968).

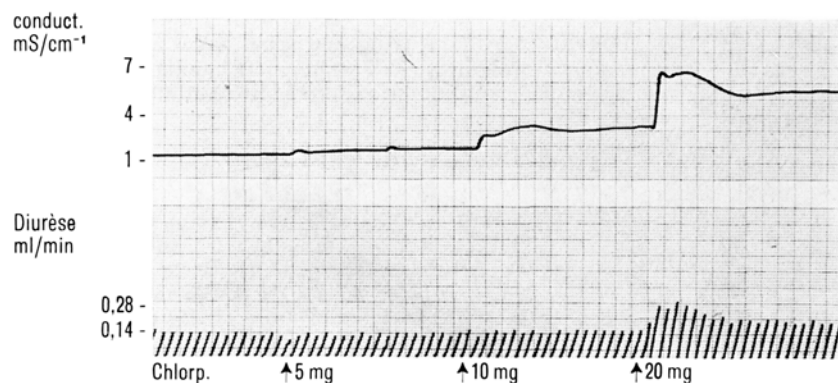


Fig. 1. Effet sur la conductivité (enregistrement du haut) et le débit urinaire (enregistrement du bas; retour au zéro toutes les min) de 3 doses de Chlorpropamide.

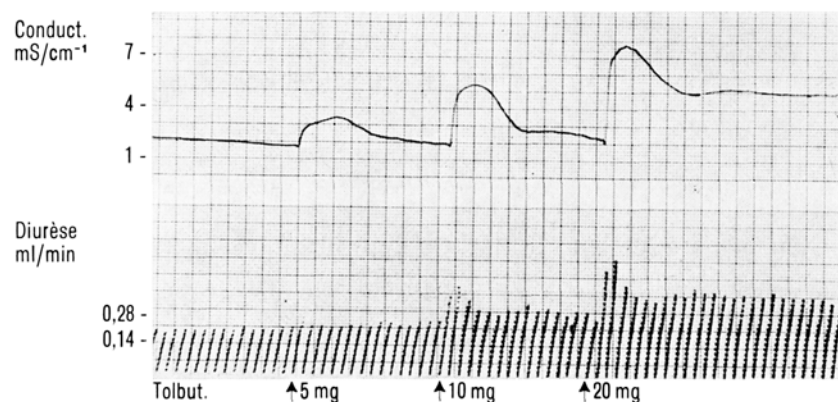


Fig. 2. Effets sur la conductivité (enregistrement du haut) et le débit urinaire (enregistrement du bas; retour au zéro toutes les min) de 3 doses de Tolbutamide.

Le Tolbutamide ne nous ayant servi que de témoin, l'analyse statistique a été moins poussée, mais les résultats globaux se recouvrent (il existe un effet-dose hautement significatif montré par analyse de variance et un effet-rat significatif pour le sodium et la diurèse, hautement significatif pour le potassium).

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle action diurétique et natriurique est signalée. MAHONEY et GOODMAN¹⁵ avaient pourtant mentionné une action natriurique, mais l'avaient attribuée à une expansion du volume des liquides extra-cellulaires, comme cela est connu. Cela ne peut être le cas chez nos animaux puisque l'injection d'un volume de 0,05 à 0,2 ml de soude à pH 8,5 n'entraîne jamais ces réactions.

Les variations de glycémie ne peuvent être en cause puisque, chaque fois, l'effet est immédiat dans la minute qui suit l'injection (cf. Figures 1 et 2).

Dans le protocole utilisé il est donc difficile d'assimiler simplement l'action des 2 sulfonylurées à une action ADH-like. C'est également ce qui ressort de l'expérimentation

tation tant sur l'animal que sur les membranes sensibles à l'hormone antidiurétique. Dans nos expériences on aurait plutôt une action de type salidiurétique, ce qui est original.

On pourrait proposer, dès lors, une nouvelle hypothèse pour comprendre l'action thérapeutique du Chlorpropamide dans le diabète insipide: cette action serait comparable à celle des salidiurétiques qui améliorent également ces diabètes. Le facteur commun semble être la perte sodée, mais le mode d'action exact est encore hypothétique. Le mode d'action proposé serait donc très différent de ceux décrits¹¹. Il ne s'agit là, évidemment, que d'une hypothèse, mais elle est renforcée par le fait que ces résultats ont été retrouvés chez l'Homme¹³ et le Rat dans d'autres conditions¹⁸.

Ceci permettrait peut-être d'expliquer certaines hyponatrémiées observées au cours de traitement par le Chlorpropamide¹⁷.

Il paraît assez étonnant que dans toutes les expérimentations présentées jusqu'à maintenant on ne se soit attaché qu'à connaître les variations de la «clearance» de l'eau libre et non les variations simultanées de l'élimination sodée. Il ne s'agit peut-être que d'un effet annexe n'ayant aucun rapport avec l'amélioration du diabète insipide, mais l'hypothèse mérite d'être étudiée¹⁸.

Tableau I. Résultats avec le Chlorpropamide 8 animaux; moyenne $\pm$ écart type de la moyenne

	Doses	Diurèse ml/15 min	Sodium μ Eq 15/min	Potassium μ Eq/15 min
Chlor- propamide (8 animaux)	Témoins	2,07 $\pm$ 0,16	4,98 $\pm$ 0,65	12,9 $\pm$ 3,06
	5 mg	2,32 $\pm$ 0,19	5,99 $\pm$ 1,35	16,4 $\pm$ 2,5
	10 mg	2,82 $\pm$ 0,30	22,53 $\pm$ 9,98	27,85 $\pm$ 4,03
	20 mg	3,92 $\pm$ 0,35	95,03 $\pm$ 21,72	44,66 $\pm$ 4,22

Zusammenfassung. Sulfonylharnstoffderivate wirken bei der mit Wasser belasteten Ratte wie ein Salidiureticum. Dieser Wirkungsmodus ist der Grund weshalb diese Pharmaka wie Salidiuretica bei Diabetes insipidus günstig wirken.

CL. GHARIB, A. M. BURGUBURU,
O. RIVET et J. SASSARD

Tableau II. Résultats avec le Tolbutamide 7 animaux; moyenne $\pm$ écart type de la moyenne

	Doses	Diurèse ml/15 min	Sodium μ Eq 15/min	Potassium μ Eq/15 min
Tolbutamide (7 animaux)	Témoins	1,87 $\pm$ 0,11	52,6 $\pm$ 29,3	54,6 $\pm$ 12,3
	5 mg	2,2 $\pm$ 0,24	74,7 $\pm$ 37,4	63,8 $\pm$ 13,45
	10 mg	3,0 $\pm$ 0,29	168,5 $\pm$ 60,8	85,7 $\pm$ 12,9
	20 mg	4,07 $\pm$ 0,46	339,2 $\pm$ 99,3	104,6 $\pm$ 20,8

Laboratoire de Physiologie A de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, 8, Avenue Rockefeller, F-69 Lyon 8 (France), 15 juillet 1970.

¹⁵ J. H. MAHONEY et A. D. GOODMAN, New Engl. J. Med. 279, 1191 (1968).

¹⁶ B. DELBARRE et CL. GHARIB, C. r. Soc. Biol., Paris 163, 2431 (1970).

¹⁷ D. FINE et H. SHEDROVILZKY, Ann. int. Med. 72, 83 (1970).

¹⁸ Remerciements: Nous remercions les Laboratoires Pfizer-Clin et Hoechst qui nous ont gracieusement fourni le Chlorpropamide et le Tolbutamide.

Insensitivity to External Hydroxyl Ions of Na Efflux from the Toad Oocyte into K-free Ringer

Elsewhere it was shown that Na efflux from the oocyte of the toad *Bufo bufo* is stimulated by alkalization of the bathing medium¹ or by K removal². The question now arising is whether or not the Na efflux into a K-free medium is similarly affected by a more alkaline pH. The following communication reports results which show that the Na exchange mechanism in the absence of external K is relatively insensitive to the addition of OH⁻ ions to the external medium.

Oocytes of 600–1200 μ m in diameter were isolated by dissection under Ringer's solution from the ovaries of specimens of *Bufo bufo*. The composition of the Ringer was that given by BITTAR, DICK and FRY¹. K-free Ringer's solution was prepared by substituting NaCl for KCl in equimolar amount. The oocytes were loaded with

²⁴NaCl as described by DICK and LEA³ and the activity of the ²⁴Na in the effluent was measured by the method of DICK and LEA³ as modified by BITTAR, DICK and FRY¹ and BITTAR² based on the use of plastic phosphor scintillator (Nuclear Enterprises 102A) as the detector.

Shown in Figure 1 is a typical experiment in which K removal, as demonstrated by BITTAR⁴, causes a rise in

¹ E. E. BITTAR, D. A. T. DICK and D. J. FRY, J. Physiol., Lond. 196, 693 (1968).

² E. E. BITTAR, Life Sci., 9, 113 (1970).

³ D. A. T. DICK and E. J. A. LEA, J. Physiol., Lond. 174, 55 (1964).

⁴ E. E. BITTAR, Life Sci., 9, 1049 (1970).