

Crustecdysone is Without Estrogenic or Antiestrogenic Activity in the Rat

Crustecdysone (β -ecdysone, 20-hydroxyecdysone or ecdysterone) occurs naturally in insects¹⁻⁴ and crustaceans⁵ and is capable of inducing moult in most arthropod groups^{6,7}. It also occurs in plants in very large quantities⁸⁻¹⁰. Ecdysone has been reported to stimulate protein synthesis in mouse liver¹¹ and to inhibit growth of sarcoma and embryonic mouse fibroblasts¹². Since the ecdysone in plants and animals is likely to find its way into cattle and humans through their food, it was thought worthwhile to scan this compound for its possible estrogenic and antiestrogenic activity.

An inbred strain of 80-120-day-old, 4-day cycling, adult mature white rats on an LD regime of 12:12, was used for the present study. The animals were maintained on Bengal gram and water supplemented with milk. Estrogenic activity was studied by Allan-Doisy test of vaginal cornification¹³ and antiestrogenic activity was studied by the vaginal response method¹⁴. The animals were spayed and when the endogenous estrogen completely disappeared, as shown by absence of vaginal cycling (a phase contrast microscope was used for examination of the smear), a priming dose of 1 μ g of estradiol dipropionate (Ovocyclin, Ciba India) in 0.1 ml olive oil was injected s.c. into each rat. When the estrogen completely disappeared from the blood stream, as shown by vaginal cycling method, a total of 30 μ g of a solution of ecdysterone (obtained through the kind courtesy of Dr. D. KING to Dr. G. C. UNNITHAN and from Dr. W. E. ROBBINS) in 0.02 ml of 50% aqueous glycerol was delivered into the vagina of each rat in 2 doses at 10.00 h on 2 consecutive days through a steel canula attached to a syringe, to a group of 10 rats. An equal number of controls were given glycerol only. Smears were taken and read at 10.00 and 17.00 h on the 3rd day. Smears of all the experimental and control animals were found equally negative. Into another group of animals, 0.6 μ g of the estrogen contained in 0.1 ml olive oil was injected s.c. at 09.00 h and 2 doses of ecdysterone in 0.02 ml of 50% aqueous glycerol (total dose, 0.5 mg) was administered intravaginally at 09.00 and 17.00 h, whereas the controls received 0.02 ml of 50% aqueous glycerol. Examination of the smear after 56, 64, and 72 h of first administration indicated no difference between the controls and the

experimentals, both being positive. Hence it may be seen that ecdysterone does not have either estrogenic or antiestrogenic activity as detectable by the methods employed. The absence of estrogenic activity to ecdysterone is in accord with the structure of estrogenic steroids which have a phenolic A-ring and a carbon atom in position 18 but not in position 19¹⁵.

Zusammenfassung. Es wird mittels Vaginalzytologie bei Ratten gezeigt, dass Ecdyson keine Östrogenaktivität und bei östrogenbehandelten Tieren auch keine Antiöstrogen-Aktivität entfaltet.

V. K. K. PRABHU and K. K. NAYAR¹⁵

Department of Zoology, University of Kerala,
Kariavattom (Trivandrum, India), 20 August 1973.

- ¹ P. HOCKS and R. WEICHERT, *Tetrahedron Lett.* 26, 2989 (1966).
- ² H. HOFFMEISTER and H. F. GRUETZMACHER, *Tetrahedron Lett.* 33, 4017 (1966).
- ³ D. H. S. HORN, E. J. MIDDLETON and J. A. WUNDERLICH, *Chem. Commun.* 11, 339 (1966).
- ⁴ P. KARLSON, *Vitam. Horm.* 14, 227 (1956).
- ⁵ F. HAMPSHIRE and D. H. S. HORN, *Chem. Commun.* 2, 37 (1966).
- ⁶ A. KRISHNAKUMARAN and H. A. SCHNEIDERMAN, *Nature, Lond.* 220, 601 (1968).
- ⁷ A. KRISHNAKUMARAN and H. A. SCHNEIDERMAN, *Biol. Bull.* 139, 520 (1970).
- ⁸ H. JIZBA, V. HEROUT and V. SORM, *Tetrahedron Lett.* 18, 1869 (1967).
- ⁹ G. B. STAAL, *Proc. K. med. Akad. Wet. Ser. C*, 70, 409 (1967).
- ¹⁰ G. B. STAAL, *Meded. LandbHoogesch. Opzoekstns. Gent.* 32, 393 (1967).
- ¹¹ W. C. BURDETTE and R. L. CODA, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 112, 216 (1963).
- ¹² W. C. BURDETTE and R. C. RICHARDS, *Nature, Lond.* 189, 667 (1961).
- ¹³ C. W. EMMENS, in *Methods in Hormone Research II* (Academic Press, New York 1962), p. 774.
- ¹⁴ R. I. DORFMAN, in *Methods in Hormone Research II* (Academic Press, New York 1962), p. 774.
- ¹⁵ A grant from the Ford Foundation and the Indian Council of Medical Research is gratefully acknowledged.

Activité protéosynthétique des glandes prothoraciques et titre d'ecdysone chez des larves permanentes de *Locusta migratoria* obtenues par irradiation sélective du tissu hématopoïétique

L'irradiation sélective du tissu hématopoïétique de jeunes larves de stade V (dernier stade larvaire) de *Locusta migratoria* bloque le déterminisme endocrine de la mue suivante, les insectes évoluant en larves permanentes; une irradiation témoin de régions ventro-abdominales de surface équivalente n'affecte pas la mue¹. Dans la présente étude nous avons suivi l'évolution des glandes prothoraciques de larves devenues permanentes à la suite d'une radiolésion du tissu hématopoïétique, en choisissant comme critère la vitesse d'incorporation d'un acide-aminé dans les protéines synthétisées pendant un laps de temps donné. D'autre part nous avons suivi l'évolution du taux d'ecdysone à la suite de la radiolésion du tissu hématopoïétique, en la comparant à celle des larves normales, décrite dans un travail précédent².

Des larves normales et des larves à tissu hématopoïétique irradié (25 000 R, anticathode en tungstène, durée de

l'irradiation: 10 min, tension appliquée 42 kV; intensité du courant de chauffage: 32 mA; distance source-objet: 15 cm) reçoivent une injection intraabdominale de leucine tritiée (activité spécifique: 30 Ci/mMol; injection unique de 30 μ l par insecte d'une solution correspondant à une radioactivité totale de 30 μ Ci par injection); les glandes prothoraciques des insectes en expérience sont prélevées aux temps 0, 10 min, 20 min et 40 min dans de l'acide perchlorique; après addition d'albumine bovine et centrifugation à 4000 g, le culot est traité à l'acide perchlorique à chaud en vue de l'extraction des seules protéines. Des lavages répétés à l'éthanol permettent de retirer la leucine radioactive non liée aux protéines. La radioactivité liée

- ¹ J. A. HOFFMANN, *C.r. Acad. Sci., Paris*, 273, 2568 (1971).
- ² J. A. HOFFMANN, J. KOOLMAN, P. KARLSON et P. JOLY, *Gen. comp. Endocr.* 22, 90 (1974).

aux protéines est déterminée dans un scintillateur liquide.

Le Tableau montre qu'aux jours 2 et 4 du V^e stade larvaire (sur une durée normale de 10 jours), les glandes prothoraciques incorporent une quantité importante de leucine radioactive dans leurs protéines synthétisées. Au début de la vie imaginale, cette quantité est nettement plus faible, mais elle se maintient à ce taux au moins jusqu'au jour 12 de la vie adulte.

Les glandes prothoraciques des larves à mue bloquée par irradiation du tissu hématopoïétique présentent 4 jours après cette intervention une très forte incorporation de leucine radioactive dans leurs protéines. Cette incorporation est nettement supérieure à celle trouvée à la même période chez les larves normales. Au 12^e et au 23^e jour consécutif à l'irradiation, nous observons une incorporation relativement faible, qui est comparable à celle trouvée dans les glandes de jeunes imagos.

Le taux d'ecdysone est déterminé à l'aide du test *Calliphora*: les extraits de *Locusta* (15 g de poids frais par dosage) sont faits selon la technique de KARLSON et SHAAVA³, chromatographiés sur couche mince (plaque de silice MERCK HF₂₅₄ épaisseur 0,25 mm), l'ecdysone et l'ecdysterone, identifiées sous la lumière UV (254 nm) grâce à des hormones de référence, sont éluées et injectées à des abdomens ligaturés de larves de *Calliphora*. Le pourcentage d'empulements obtenus permet d'estimer l'activité hormonale de l'extrait, grâce à des courbes de référence obtenues à l'aide d'injection d'hormones cristallisées.

Alors qu'au cours de l'évolution normale du V^e stade larvaire de *Locusta*, nous trouvons une très importante synthèse d'ecdysone², nous n'avons à aucun moment pu déceler de l'ecdysone ou de l'ecdysterone chez les larves dont le tissu hématopoïétique avait été irradié au préalable. Rappelons que les quantités maximales d'activité hormonale trouvées au cours du développement normal du V^e stade larvaire de *Locusta* correspondent à plus de 100 fois la valeur du seuil minimum d'activité décelable qui se situe autour de 10 ng d'ecdysone par g de poids frais de *Locusta*. D'autre part, les larves ayant subi une irradiation-témoin d'une zone ventrale abdominale, présentent une importante synthèse d'ecdysone; ces larves, comme nous l'avons indiqué plus haut, muent de façon plus ou moins normale.

Incorporation de leucine tritiée dans les protéines des glandes prothoraciques chez les larves normales de stade V, chez les imagos et chez les larves de stade V à tissu hématopoïétique irradié

Age physiologique	Radioactivité liée aux protéines, comptée en coups par min pour 8 glandes aux temps		
	0 min	10 min	40 min
Larves normales de stade V, jour 2	0	1890	2413
Larves normales de stade V, jour 4	0	895	1796
Imagos normaux de jour 2	0	536	552
Imagos normaux de jour 12	0	43	474
Larves de stade V, jour 4; irradiation du tissu hématopoïétique au jour 0	0	1566	7205
Larves de stade V, jour 11; irradiation du tissu hématopoïétique au jour 0	0	72	200
Larves permanentes de stade V, jour 23; irradiation du tissu hématopoïétique au jour 0	0	42	375

Les résultats de notre étude nous amènent à admettre en premier lieu que la radiolésion du tissu hématopoïétique, quoique bloquant le déterminisme de la mue, n'empêche pas les importantes synthèses protéiques des glandes prothoraciques; ces synthèses apparaissent au contraire plus intenses dans les glandes prothoraciques après radiolésion du tissu hématopoïétique. Ces résultats cadrent parfaitement avec les études ultrastructurales faites sur les glandes prothoraciques de larves à tissu hématopoïétique irradié, qui présentent des signes évidents d'une intense activité protéosynthétique⁴. D'autre part, des expériences de transplantations de glandes prothoraciques de larves à tissu hématopoïétique irradié à des larves prothoracectomisées permettent de rétablir le déterminisme de la mue chez ces dernières⁴. Nous pouvons donc conclure que l'irradiation du tissu hématopoïétique n'empêche pas le fonctionnement des glandes prothoraciques, mais qu'elle semble même stimuler la protéosynthèse dans ces glandes.

Il est d'un grand intérêt de constater que les larves à tissu hématopoïétique irradié ne présentent, malgré la présence de glandes prothoraciques actives, aucune trace décelable d'ecdysone ou d'ecdysterone. Il nous paraît dans ces conditions difficile d'accepter l'idée que la seule fonction des glandes prothoraciques soit la synthèse de l'ecdysone. La forte activité protéosynthétique, mise en rapport avec les observations ultrastructurales précédentes^{5,4} nous incite plutôt à croire que ces glandes élaborent normalement un facteur protéique nécessaire à la réalisation de la mue.

Les conclusions de cette étude, qui vont dans une certaine mesure dans le même sens que celles des travaux expérimentaux de BONNER WEIR⁶ sur le Lépidoptère *Calpodex* ou des observations ultrastructurales de LOCKE⁷, de L. JOLY et al.⁵ et de RINTERKNECHT et al.⁸, posent au moins trois problèmes: quelle est la nature exacte et la fonction du facteur protéique élaboré par les glandes prothoraciques? quel est le tissu qui synthétise les grandes quantités d'ecdysone trouvées au cours du développement normal de *Locusta migratoria*? par quel mécanisme le tissu hématopoïétique intervient-il dans le déterminisme de la mue?

Summary. The prothoracic glands of permanent fifth instar larvae of *Locusta migratoria* (moulting blocked by selective X-ray treatment of the hemocytopoietic tissue) are in a state of high activity as evidenced by the rate of incorporation of a labelled amino-acid into the proteins synthesized in these glands. Such permanent larvae apparently synthesize no ecdysone nor ecdysterone.

J. A. HOFFMANN et MARIE-JOSÉE WEINS

Laboratoire de Biologie Générale et
Equipe de Recherche Associée au CNRS,
Biologie Humorale des Insectes,
12, rue de l'Université,
F-67 Strasbourg (France),
21 janvier 1974.

³ P. KARLSON et E. SHAAVA, J. Insect Physiol. 10, 797 (1964).

⁴ L. JOLY, M. J. WEINS, J. A. HOFFMANN et A. PORTE, Z. Zellforsch. 137, 387 (1973).

⁵ L. JOLY, P. JOLY et A. PORTE, C.r. Acad. Sci., Paris 269, 917 (1969).

⁶ S. BONNER WEIR, Nature, Lond. 228, 580 (1970).

⁷ J. A. HOFFMANN et J. KOOLMAN, J. Insect Physiol. in press (1974).

⁸ E. RINTERKNECHT, A. PORTE et P. JOLY, C.r. Acad. Sci., Paris, in press (1974).