

Mue et vitellogenèse chez *Orchestia gammarella* Pallas (Crustacé Amphipode): étude de la synthèse de la fraction protéique femelle après introduction d'ecdystérone

Molting and Vitellogenesis in *Orchestia gammarella* Pallas (Crustacea Amphipoda): Study of the Female-Specific Protein Synthesis After Ecdysterone Administration

Chez l'Amphipode *Orchestia gammarella*, la vitellogenèse s'effectue exactement dans les limites d'un intermue (23–24 jours à 18–22°C) et la ponte suit immédiatement l'exuviation¹.

La synthèse de la fraction protéique femelle (FPF), l'un des principaux constituants du vitellus, est également liée au cycle de mue. Extrêmement faible, sinon nulle, en début d'intermue (stades A et B), cette synthèse s'élève considérablement à partir du stade C, reste importante jusqu'au stade D₂, puis diminue peu de temps avant l'exuviation². Ce synchronisme des phénomènes de mue et de vitellogenèse suggère la possibilité d'un contrôle commun ou d'une interaction.

Nous avons cherché à savoir si l'ecdystérone (hormone de mue des Crustacés), introduite aux différents stades de l'intermue, a un effet sur la synthèse de la FPF.

Matériel et méthodes. L'ecdystérone (Mann Research Lab., N.Y.) est introduite sous la forme de cristaux chez 56 femelles venant de pondre (stades A et B) ou en cours de vitellogenèse (stades C et D)³, à une dose d'environ 200 µg/g d'animal. Après un délai variant de 1 à 10 jours, ces femelles reçoivent une injection de 2,5 µl d'une solution de leucine ³H, soit 2,5 µCi (L-leucine ³H-4-5, A.S.: 54 Ci/mM, Radiochemical Ctr., Amersham). 6 h après l'injection, nous prélevons sur chaque animal une quantité d'hémolymphe égale ou supérieure à 3 µl que nous soumettons à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide^{2,4}. La radioactivité est mesurée dans la zone de l'électrophorogramme correspondant à la FPF (bandes «a» et «b»)². Les résultats sont exprimés en cpm/3 µl d'hémolymphe.

Résultats. 1. Femelles ayant reçu de l'ecdystérone durant les stades A et B du cycle d'intermue. 1, 2 ou 4–5 jours après l'introduction d'ecdystérone, ces femelles se trouvent respectivement en D₀, D_{1a} ou D₂. Après un laps de temps de 6, 7 ou 10 jours, elles sont physiologiquement en postmue, c'est-à-dire qu'elles ont dépassé le stade D₂ mais n'ont pas pu exuvier⁵. Après ces divers délais, la radioactivité de la FPF est extrêmement faible ou négligeable (Tableau I).

L'étude histologique des ovaires de ces animaux expérimentaux montre qu'à partir de 4 jours, les ovocytes commencent à accumuler du matériel APS⁺. Après 5 à 6 jours, ils atteignent un diamètre moyen de 200 µm⁵ et présentent alors, à la dissection, une très légère coloration violette due à la présence de FPF dans leur cytoplasme. Ces différentes observations semblent témoigner d'un début de vitellogenèse. 10 jours plus tard, les plus gros ovocytes des femelles en postmue commencent à dégénérer, tandis que leur taille n'excède pas 250 µm. Rappelons que les ovocytes des femelles normales ont un diamètre qui varie entre 150 µm au début de la vitellogenèse et 800 µm à la fin de celle-ci.

2. Femelles ayant reçu de l'ecdystérone durant le stade C du cycle d'intermue. A la différence des femelles précédemment étudiées, celles qui ont reçu l'ecdystérone en C synthétisent la FPF. Des variations de l'intensité de cette synthèse sont observées tant chez les animaux expérimentaux (Tableau I) que chez les témoins (Tableau II)².

L'ecdystérone exogène ne provoque d'accélération que sur les processus de la mue, le développement des ovocytes se poursuivant normalement. Par suite, la vitello-

genèse n'est pas complètement achevée en fin d'intermue⁶.

Chez quelques femelles (Tableau I*), l'incorporation de la leucine ³H a été négligeable ou nulle. Ce résultat s'explique vraisemblablement par l'entrée de ces femelles en période de repos sexuel²; en effet, bien qu'elles aient pondu au début du cycle d'intermue, leurs ovaires ne présentaient pas de nouvelle vitellogenèse. Ce cas a été également observé chez deux témoins (Tableau II*).

3. Femelles ayant reçu de l'ecdystérone durant le stade D du cycle d'intermue. L'ecdystérone, introduite en D, a une action faible ou nulle sur les phénomènes de mue en cours³. Comme chez les témoins, l'incorporation de la leucine ³H au niveau de la FPF diminue généralement en fin d'intermue (stade D₂) (Tableaux I et II)².

La vitellogenèse en cours s'achève en un temps normal; les oeufs sont pondus et se développent³.

Discussion. L'ecdystérone, introduite chez des femelles en début d'intermue (stade A ou B), déclenche prématurément et accélère les processus de la mue, tandis qu'elle n'a pas d'effet comparable sur la synthèse de la FPF qui demeure extrêmement faible, sinon nulle. Après un délai de 1 ou 2 jours, ces animaux atteignent en effet le stade D₀ ou D_{1a}, mais ils n'effectuent pas, comme les témoins se trouvant aux mêmes stades, une forte synthèse de FPF (Tableaux I et II)². Le cas des femelles qui ont atteint le stade D₂ 4 à 5 jours après l'introduction de l'ecdystérone suggère la possibilité d'un rôle inhibiteur de cette hormone sur le démarrage d'une synthèse importante de FPF (ou éventuellement sur la libération de cette dernière). En effet, ces animaux (Tableau I**) seraient normalement en C_a et devraient, par conséquent, être déjà le siège d'une importante synthèse de FPF (Tableau II)². Lorsque le délai est supérieur à 5 jours, les animaux sont en postmue et ne tardent pas à mourir. La faible radioactivité de la FPF observée chez ces individus (Tableau I) est donc difficilement interprétable.

L'absence de synthèse importante de FPF chez tous ces sujets expérimentaux est probablement liée à l'arrêt constaté dans l'évolution des ovocytes (ces derniers, tout en présentant quelques indices d'un début de vitellogenèse, ne dépassent pas 250 µm).

Lorsque l'ecdystérone est introduite en C, les processus de mue sont accélérés mais la synthèse de la FPF et la vitellogenèse, déjà engagées lors de l'administration de l'hormone, se poursuivent normalement. Dans ce cas, les résultats obtenus prouvent qu'une augmentation expérimentale du taux d'ecdystérone ne provoque pas

¹ H. CHARNIAUX-COTTON, Ann. Sci. nat. Zool. Biol. Animale 19, 411 (1957).

² J.-J. MEUSY, H. JUNÉRA et Y. CROISILLE, C. r. Acad. Sci., Paris 279, 587 (1974).

³ M.-F. BLANCHET et H. CHARNIAUX-COTTON, C. r. Acad. Sci., Paris 272, 307 (1971).

⁴ H. JUNÉRA, J.-J. MEUSY et Y. CROISILLE, C. r. Acad. Sci., Paris 278, 655 (1974).

⁵ M.-F. BLANCHET, C. r. Acad. Sci., Paris 274, 3015 (1972).

⁶ L'un de nous a signalé précédemment³ que l'introduction d'ecdystérone chez des femelles en reproduction provoquait un déclenchement prématuré des phénomènes de mue mais n'influaient pas sur la durée totale de l'intermue; la vitellogenèse s'effectuait alors complètement. Ces résultats préliminaires, obtenus avec un autre lot d'ecdystérone, n'ont pas été confirmés.

Tableau I. Incorporation de la leucine ^3H dans la fraction protéique femelle de l'hémolymph, chez des femelles d'*O. gammarella* ayant reçu de l'ecdystérone

Stade d'intermue lors de l'introduction de l'ecdystérone	Délai entre l'introduction et l'injection de leucine ^3H (jours)	Stade d'intermue lors de l'injection de leucine ^3H	Radioactivité de la FPF (zone des bandes «a» et «b» de l'électrophorogramme) (cpm/3 μl)
A	1	D ₀	192
	1	D ₀	221
	1	début D ₀	191
	1	début D ₀	114
	2	D ₀	44
	2	D ₀	187
	2	D ₀	131
	2	D _{1'a}	289
	2	D _{1'a}	313
	4	D ₂	69**
	5	D ₂	45**
	6	postmue	147
B	7	postmue	205
	7	postmue	44
	10	postmue	86
	4	D ₀	369
	4	D _{1'c}	560
Ca	4	D _{1'c}	1 439
	5	début D ₂	60
	5	D ₂	756
	7	postmue	61
	7	postmue	176
Cb	2	D ₀	67*
	2	D ₀	669
	2	D _{1'a}	168*
	2	D _{1'a}	4 097
	2	D _{1'c}	7 309
Cc	3	D _{1'a}	1 364
	1	début D ₀	8 925
	2	D _{1'b}	6 987
	2	D _{1'c}	11 744
	5	D _{1'c}	1 257
D ₀	5	début D ₂	282*
	5	début D ₂	2 412
	5	D ₂	5 012
	1	D _{1'a}	6 290
	2	D _{1'b}	9 614
D _{1'a}	2	D _{1'c}	65*
	5	D ₂	2 493
	5	D ₂	2 030
	5	fin D ₂	3 053
	5	D ₂	1 296
D _{1'b}	1	D _{1'a}	9 527
	1	D _{1'a}	8 996
	1	D _{1'b}	20 570
	5	D ₂	1 111
	5	D ₂	2 550
D _{1'c}	2	fin D _{1'c}	8 513
	2	fin D _{1'c}	9 083
	5	D ₂	6 076
	5	D ₂	2 545
	5	D ₂	2 550
D ₂	5	D ₂	1 296
	2	D ₂	3 583
	2	D ₂	322
	2	fin D ₂	1 779
	4	fin D ₂	2 333
D ₂	4	fin D ₂	555
	4	fin D ₂	555

d'inhibition ni d'activation de la synthèse de la FPF et de la vitellogenèse (Tableaux I et II),².

Enfin, l'ecdystérone introduite en D n'a pas d'effet sur la mue, sur la synthèse de la FPF et sur la vitellogenèse; par suite, le synchronisme entre les phénomènes de mue et de vitellogenèse est conservé.

L'ensemble de ces observations diffère de celles effectuées par FALLON et al.⁷ chez le moustique *Aedes aegypti* où l'injection de β -ecdysone (ecdystérone) induit la synthèse de la «vitellogenin», c'est-à-dire d'une protéine du vitellus homologue de la FPF des Crustacés. En outre, ces auteurs considèrent que la β -ecdysone pourrait être identique à la «vitellogenin stimulating hormone» (VSH) dont ils avaient précédemment établi l'existence⁸. Bien qu'une hormone ovarienne comparable à la VSH existe très vraisemblablement aussi chez les Crustacés, ainsi que nous en avons émis l'hypothèse dès 1971⁹, nous pensons pouvoir affirmer qu'elle ne peut pas être assimilée à la β -ecdysone, laquelle n'a, chez *Orchestia gammarella*, aucune action stimulante sur la synthèse de la FPF. D'autre part, nos expériences n'ont pas apporté d'élément déterminant permettant d'expliquer le synchronisme observé chez cette espèce entre la mue et la vitellogenèse puisqu'un apport d'ecdystérone a provoqué, dans certains cas, la désynchronisation de ces deux processus. Il serait intéressant de poursuivre les expérimentations pour savoir si un taux bas d'ecdystérone au début du cycle d'intermue constituerait le signal nécessaire au démarrage de la vitellogenèse, ainsi que TOUIR et CHARNIAUX-

Tableau II. Incorporation de la leucine ^3H dans la fraction protéique femelle de l'hémolymph, chez des femelles témoins d'*O. gammarella*

Stade d'intermue lors de l'injection de leucine ^3H	Radioactivité de la FPF (zone des bandes «a» et «b» de l'électrophorogramme) (cpm/3 μl)
Ca	2 037
fin Ca	3 242
fin Ca	4 730
Cb	4 590
Cb	260*
fin Cb	6 697
fin Cb	7 574
fin Cb	1 773
Cc	10 155
Cc	3 449
D ₀	570*
D ₀	10 549
D ₀	5 218
fin D ₀	11 281
fin D ₀	28 646
D _{1'a}	35 537
D _{1'b}	12 721
D ₂	7 531
D ₂	2 434
D ₂	10 955
fin D ₂	2 200
fin D ₂	2 728

⁷ A. M. FALLON, H. H. HAGEDORN, G. R. WYATT and H. LAUFER, J. Insect. Physiol. 20, 1815 (1974).

⁸ H. H. HAGEDORN and A. M. FALLON, Nature, Lond. 244, 103 (1973).

⁹ J.-J. MEUSY, H. JUNÉRA et Y. CROISILLE, C. r. Acad. Sci., Paris 273, 592 (1971).

COTTON en ont émis l'hypothèse¹⁰, et lierait ainsi le déroulement de la vitellogenèse à celui de la mue chez *O. gammarella*.

¹⁰ A. TOUIR et H. CHARNIAUX-COTTON, C. r. Acad. Sci., Paris 278, 119 (1974).

¹¹ Nous remercions le Prof. H. CHARNIAUX-COTTON et le Dr. Y. CROISILLE pour les conseils qu'ils nous ont prodigués au cours de la rédaction de ce manuscrit ainsi que Mlle M. MARTIN pour sa collaboration technique. Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'ERA No. 409 du CNRS et avec l'aide de la DGRST (contrat No. 74.7.0021).

Summary. Ecdysterone, administered to *Orchestia gammarella* females (200 µg/g), has no positive effect on the female-specific protein synthesis and vitellogenesis.

M.-F. BLANCHET, H. JUNÉRA
et J.-J. MEUSY¹¹

Université Pierre et Marie Curie,
Laboratoire de Sexualité et Reproduction des Invertébrés,
Tour 32, 4 Place Jussieu, F-75230 Paris-Cedex 05
(France), 5 février 1975.

The Effect of Heat on Rat Pineal Hydroxyindole-O-Methyl Transferase Activity

Exposure to continuous light was found to affect basal and specific metabolic pathways in the rat pineal gland, causing inhibition of most processes and enhancing others¹. Environmental stimuli other than light, e.g. temperature^{2,3} and noise⁴, have also been found to affect pineal metabolism. Exposure of rats to low temperature produced pineal hypertrophy and increased metabolic activity², while heat decreased pineal contents of protein and RNA³. The possibility was considered that the pineal gland could, in addition to the stimuli of light, also be transducing stimuli of temperature^{3,5}. In order to give further substance to this postulation, it was decided to investigate whether exposure to continuously elevated environmental temperature affects specific pineal metabolic processes. The effect of heat on the terminal reaction in the synthesis of melatonin, the methoxylation of N-acetyl-serotonin by hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) is reported here.

Materials and methods. Male rats weighing 160–180 g were divided into 3 groups of 8 animals each (4 to a cage). 2 groups were exposed to constant heat of $33 \pm 1^\circ\text{C}$ for 1 and 3 days respectively, and the 3rd group, which served as control, was kept at a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Light was provided by overhead fluorescent tubes which were automatically switched on at 06.00 h and off at 18.00 h each day. After 1 or 3 days' exposure to heat, the rats were decapitated between 22.30 h and 23.30 h, their pineal glands were removed rapidly, rinsed in cold phosphate buffer and ground in 0.5 ml phosphate buffer pH 7.9. All samples were made in duplicate. HIOMT activity was estimated immediately by the method of AXELROD et al.⁶. N-acetylserotonin used was purchased from Sigma Chemical Company and ¹⁴C-methyl-S-adenosylmethionin (spec. activity 58 mCi/mmole) from New England Nuclear.

Results. From the Table it can be seen that already after one day's exposure to heat of $33 \pm 1^\circ\text{C}$ a significant decrease (17%) in pineal HIOMT is evident. When

exposure is prolonged to 3 days, the depressant effect of heat on HIOMT increased still further to 26.5%.

Discussion. Exposure of adult male rats to continuously elevated temperature of $32\text{--}34^\circ\text{C}$ caused a significant decrease in the melatonin forming capacity of the pineal gland. The effect was already evident after 24 h exposure to heat, and increased still further during the course of the next 48 h (Table). Examination after 10 days' exposure did not reveal any further changes. Comparing this effect to the diminished pineal contents of RNA and protein, which were observed only after rats had been exposed to the same temperature ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) for 20 and 30 days³, one may assume that the effect of heat on the melatonin-forming enzyme HIOMT is not a result of a general inhibition of metabolism but rather a specific response to heat.

Exposure of rats to extreme temperatures has converse effects on pineal gland and gonads: low temperatures ($3\text{--}10^\circ\text{C}$) enhance the metabolic activity of the pineal gland^{2,5} but cause involution and decreased weight of gonads^{7,8}. In the present study, it was found that an elevated temperature of $33 \pm 1^\circ\text{C}$ caused a decrease in the HIOMT activity involved in the specific metabolic process of production of melatonin, considered an active pineal hormone. This is in agreement with previous findings on general protein metabolism³. Consequently, because of the decreased pineal metabolism brought about by heat, a concomitant increase in the development of the gonads may occur through activation of the neuro-endocrine axis, as indeed has been reported⁹. Heat thus acts similarly to light, which produces an even more marked decline in the activity of HIOMT in rats maintained in continuous light¹⁰.

Effect of continuous heat ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) on rat pineal HIOMT activity*

	Days of exposure		Control
	1	3	$23 \pm 1^\circ\text{C}$
	46.1 ± 2.4^b	40.8 ± 2.8^c	55.4 ± 2.7
Number of samples	16	14	23

*µmole melatonin ¹⁴C formed/pineal/h \pm S.E.M. ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.0005$.

¹ W. B. QUAY, *Pineal Chemistry, in Cellular and Physiological Mechanisms* (Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illinois 1974).

² R. MILNE, V. DEVEČERSKI, N. ŠIJAČKI and R. KRSTIĆ, *Hormones* 7, 321 (1970).

³ I. NIR, N. HIRSCHMANN and F. G. SULMAN, *Experientia* 28, 701 (1972).

⁴ R. MILNE, V. DEVEČERSKI and R. KRSTIĆ, *Acta anat. Suppl.* 56, 293 (1969).

⁵ C. D. BUCANA, M. J. NADAKAVUKAREN and J. L. FREHN, *J. Neurocyt.* 2, 237 (1973).

⁶ J. AXELROD, R. J. WURTMAN and S. SNYDER, *J. biol. Chem.* 240, 949 (1965).

⁷ R. A. HOFFMAN, R. J. HESTER and C. TOWNS, *Comp. Biochem. Physiol.* 15, 525 (1965).

⁸ R. J. REITER, *J. Reprod. Fertil.* 16, 217 (1968).

⁹ S. DIKSTEIN, Y. KAPLANSKI, Y. KOCH and F. G. SULMAN, *Life Sci.* 9, 1191 (1970).

¹⁰ R. J. WURTMAN, J. AXELROD and L. S. PHILIPS, *Science* 142, 1071 (1963).