

of estradiol on activity of enzyme monoamine oxidase are in agreement with previous studies on normal and cyclic animals^{16,17}. HOLZBAUER and YODIM^{6,7} noticed increase in activity of enzyme monoamine oxidase after progesterone pretreatment of female rats during estrus cycle. But we find inhibition of the monoamine oxidase at 0 h parturition. This could be interpreted on the basis of 2 major discrepancies: 1. The endocrine status of pregnant rats during late gestation and at 0 h parturition. 2. Use of different substrates for monoamine oxidase assays.

The first point is the most important, since during late pregnancy there are marked fluctuations in the secretion of progesterone and estrogens in the rats. Estradiol concentration in plasma and ovaries increases several fold from 17th day post coitum to the onset of parturition¹⁸ whereas progesterone content is greatly depressed during the last few days of gestation^{19,20}. Moreover, the ratio of free and bound progesterone changes markedly approaching parturition²¹. This is why recent reports on the role of progesterone in controlling monoamine metabolism in normal and cyclic animals cannot be compared with our present findings in pregnant rats due to great modifications in endocrine gland secretions during pregnancy. The second reason is the choice of substrate for enzyme assays. Recently it has been shown that both the enzymes of monoamine metabolism exist in many multiple forms, each having its own specific physicochemical properties. HOLZBAUER and YODIM^{6,7} found that activity of monoamine oxidase was much higher when they used tyramine, kinuramine or dopamine as a substrate, while it was hardly changed using tryptamine as a substrate. We used tryptamine as a substrate for our monoamine oxidase assays. It may be an important explanation for the dis-

crepancy in results. The role of endocrine function for regulation of monoamine metabolism during pregnancy can also be supported by our recent paper on the evolution of enzymes monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase during late pregnancy and parturition²². We observed variations of high statistical significance in release, storage and excretion of catecholamines during pregnancy in rats and rabbits^{23,24}.

From the present results, it is evident that estradiol and progesterone administered exogenously inhibit the processes of monoamine metabolism during late pregnancy. The mechanism of action of progesterone seems different in normal and pregnant animals, since endocrine activity is greatly modified due to gestation. Estradiol inhibition is stronger than progesterone. These results may have some clinical implication for toxæmic and irregular pregnancies.

¹⁶ J. SOUTHGATE, in *Advances in Biochemical Pharmacology* (Eds. M. SANDLER and E. COSTA, Raven Press, New York 1972), vol. 5, p. 263.

¹⁷ S. PARVEZ, D. Sci. Thesis Paris University 1975.

¹⁸ A. A. SHAIKH, *Biol. Reprod.* 5, 297 (1971).

¹⁹ W. G. WIEST, W. R. KIDWELL and K. BALOUGH, *Endocrinology* 82, 844 (1968).

²⁰ W. G. WIEST, *Endocrinology* 87, 43 (1970).

²¹ W. G. WIEST, in *Progesterone*, Ciba Foundation Study Group No. 34. (Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME and J. KNIGHT; A. Churchill, London 1969).

²² S. PARVEZ, H. S. PARVEZ and M. B. H. YODIM, *Br. J. Pharmac.* 53, 241 (1975).

²³ S. PARVEZ, D. GRIPOIS and H. PARVEZ, *Hormone Res.* 5, 245 (1974).

²⁴ S. PARVEZ and H. PARVEZ, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, in press (1975).

Effets précoces de l'hormone de croissance sur les phosphates sériques et urinaires du rat

Early Effects of Growth Hormone on Blood and Urinary Inorganic Phosphorus in the Rat

D. DURAND, M. PRÉLOT et Y. RAOUL

Laboratoire de Physiologie, U.E.R. Mécanisme d'action des médicaments et des toxiques, 4, avenue de l'Observatoire, F-75270 Paris Cedex 06 (France), et Faculté mixte de Médecine et Pharmacie, F-49 Angers (France), 4 août 1975.

Summary. From the kinetic study of the effects of one single growth hormone (GH) injection on the phosphate metabolism, it appears that the influence of GH on the serum phosphate level is biphasic: a decrease is followed by an increase. Conversely GH leads to an early decrease of the urinary phosphate excretion.

De nombreux faits expérimentaux et cliniques impliquent l'hormone de croissance (GH) dans le métabolisme de l'ion phosphate. Celle-ci fait disparaître l'hypophosphatémie consécutive à l'hypophysectomie¹. Son hypersecretion dans l'acromégalie² s'accompagne d'une hyperphosphatémie pouvant aussi être obtenue chez l'Homme³ et chez l'animal à condition que l'hormone soit administrée pendant plusieurs jours⁴ et qu'il y ait une imprégnation thyroïdienne suffisante⁵.

Cependant aucune étude des effets aigus de GH ne permet actuellement d'attribuer à GH un rôle dans l'homéostasie du métabolisme des phosphates et en particulier dans la régulation de la phosphatémie. Or cette régulation pose le problème de la composante hyperphosphatémiant. En effet la parathormone et la thyrocalcitonine, qui assurent la régulation de la calcémie par leurs effets inverses sur le métabolisme osseux, agissent dans le même sens sur le taux sérique des

phosphates entraînant une hypophosphatémie. Hyperphosphatémiant à long terme, GH peut représenter le facteur tendant à élever la phosphatémie et à s'opposer ainsi aux effets hypophosphatémiant de la parathormone et de la thyrocalcitonine. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons poursuivi l'étude cinétique des effets d'une injection unique de GH, donc à court terme, sur les phosphates sériques et urinaires du rat normal.

Méthodes. Les ratte Sprague Dawley utilisées, âgées de plus de 100 jours, reçoivent un régime standard (calcium; 0,81 g/100 g, phosphore 0.55 g/100 g) au

¹ C. H. LI, I. I. GESCHWIND et H. M. EVANS, *Endocrinology* 44, 67 (1949).

² J. CORVILAIN et M. ABRAMOW, *J. clin. Endocr.* 34, 452 (1972).

³ H. GERSHBERG, *J. clin. Endocr. Metab.* 20, 1107 (1960).

⁴ M. PRÉLOT et E. LE BAS, *C. r. Soc. Biol.*, Paris 161, 1258 (1967).

⁵ D. DURAND et M. PRÉLOT, à paraître (1975).

Elimination fractionnée des phosphates urinaires (mg de P) après une seule injection de GH (250 µg/100 g)

Temps de recueil des urines	Traitement		Bilan
	NaCl	GH	
3 h	0,502 ± 0,049 (19)	0,280 ± 0,054 (20)	-0,222 ^a
6 h	1,484 ± 0,182 (6)	0,573 ± 0,104 (6)	-0,911 ^a
9 h	3,047 ± 0,229 (6)	1,082 ± 0,170 (6)	-1,965 ^b
24 h	14,671 ± 0,652 (27)	11,518 ± 0,607 (29)	-3,153 ^b

Le nombre d'animaux utilisés est indiqué entre parenthèses. Analyse statistique, test F de FISHER: ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,001$.

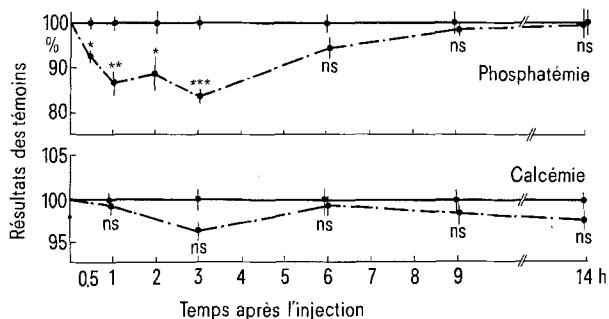


Fig. 1. Variations de la phosphatémie et de la calcémie de la ratte adulte après une seule injection de 250 µg de GH pour 100 g de poids corporel. — Animaux témoins; --- animaux traités. Analyse statistique, test F de FISHER: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

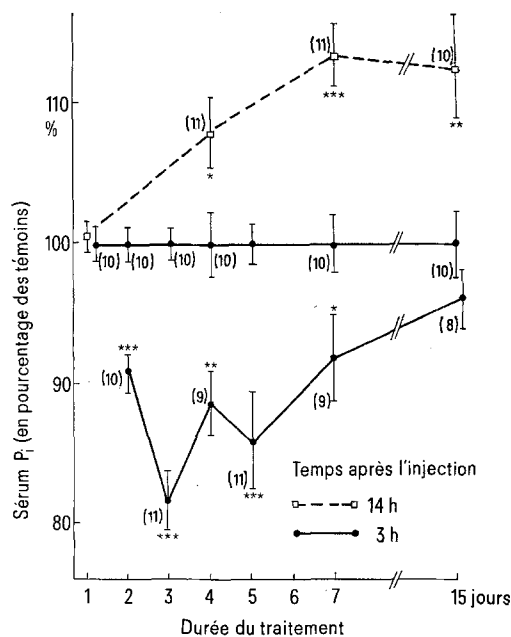


Fig. 2. Modifications de la phosphatémie de la ratte adulte normale après une injection quotidienne répétée de GH (250 µg pour 100 g de poids corporel). Les prélèvements de sang sont effectués 3 et 14 h après les injections de GH. Analyse statistique, test F de FISHER: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

moins 10 jours avant l'expérience. L'hormone de croissance bovine (GH-B16-NIH) est administrée par voie i.p. (250 µg/100 g de poids corporel). A des temps variables, le sang des animaux témoins ou traités est recueilli sans anticoagulant par ponction intra-cardiaque sous légère anesthésie à l'éther. Pendant le recueil des urines, les animaux placés individuellement dans des cages à métabolisme sont à jeun, mais reçoivent de l'eau distillée à volonté.

Les phosphates inorganiques solubles (Pi) exprimés en P sont déterminés suivant la méthode de MABRY⁶ avec un autoanalyseur Technicon, et le calcium par spectrophotométrie d'absorption atomique.

Résultats. 1 et 3 h après une injection de GH la phosphatémie de l'animal normal s'abaisse de façon hautement significative (Figure 1). A la 6^e h les Pi sériques retrouvent le taux des témoins pour s'y maintenir (9^e et 14^e h). L'hypophosphatémie, qui est d'autant plus nette que la dose injectée est plus élevée (effet log-dose linéaire), a été aussi obtenue avec une préparation commerciale de GH (hormone somatotrope Choay), mais non avec les hormones antéhypophysaires (ACTH, TSH, LH, FSH, prolactine) aux doses contaminant les préparations de GH. Simultanément nous n'observons aucune variation significative de la calcémie.

Hyperphosphatémie à long terme? GH déprime donc le taux sérique des phosphates dans les heures qui suivent son injection. L'enchaînement des deux effets opposés de l'hormone a été étudié en observant les effets de GH 3 et 14 h après une injection quotidienne d'hormone pendant 15 jours (Figure 2). 3 h après chaque administration hormonale, nous retrouvons la diminution des Pi sériques, qui, à partir du 4^e jour du traitement, fait place à une hyperphosphatémie à la 14^e h. Avec la poursuite du traitement, alors que l'hyperphosphatémie s'accroît, la dépression précoce de la phosphatémie (3^e h) s'atténue mais reste significative comparée à la phosphatémie de la 14^e h.

Une élimination urinaire accrue de l'anion pourrait rendre compte de l'hypophosphatémie précoce comme c'est le cas pour la parathormone⁸. Il n'en est rien, une injection de GH provoque chez l'animal normal une diminution précoce de l'élimination urinaire des phosphates (tableau). Le recueil fractionné des urines montre que la rétention phosphatée s'accroît progressivement pendant 24 h et qu'elle se maintient après le retour de la phosphatémie à la normale. L'hypophosphaturie, d'autant plus importante que la dose de GH administrée est plus élevée, se manifeste indépendamment de toute variation de la créatinine urinaire. La calciurie ne subit aucune modification (résultats non représentés).

Discussion. L'hypophosphatémie précoce et transitoire, mise en évidence dans nos expériences sous l'effet de GH, contraste avec l'hyperphosphatémie tardive classiquement décrite^{7,9}. La GH exerce donc deux effets successifs et opposés sur le taux sérique des phosphates. Nous étendons ainsi à la phosphatémie un phénomène déjà décrit à propos des effets de cette hormone sur les taux sériques

⁶ C. C. MABRY, R. E. GEVEDON, I. E. ROECKEL et N. GOGHMAN, *Am. J. clin. Path.* 46, 265 (1966).

⁷ M. PRÉLOT, D. DURAND et H. BELDON, *J. Physiol.*, Paris 63, 705 (1971).

⁸ T. N. PULLMAN, A. R. LAVENDER, I. AHO et H. RASMUSSEN, *Endocrinology* 67, 570 (1960).

⁹ J. CORVILAIN, *Acta clin. Belg.* (suppl.) 3, 1 (1966).

du glucose et des acides gras libres^{10, 11}. Ces faits soulignent le type insulinaire des effets précoces de GH, l'insuline, étant hypophosphatémiant¹² et favorisant la pénétration des phosphates dans les cellules¹³.

La rétention rénale des Pi, précoce et persistante, que nous observons démontre d'une part que l'hypophosphatémie induite par GH est indépendante de toute variation de l'élimination urinaire des Pi et d'autre part que la GH exerce un effet rénal ne nécessitant pas la répétition du traitement, bien qu'une seule injection de GH ne modifie pas le transport maximum des phosphates chez le chien pour CORVILAIN⁹. L'absence de facteur hormonal tendant à élever rapidement le taux sérique des Pi (dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites ici, une seule injection d'iodothyronine ne modifie pas la phosphatémie — observations personnelles) confirme que le maintien de la concentration cellulaire en phosphore des tissus mous est l'élément primordial¹⁴. Les Pi plasmatiques représentent une forme disponible de transport vers le stock des Pi cellulaires¹⁵ qui participent au pool des groupements phosphorylés. Cette conception de la régulation des phosphates peut expliquer l'effet hypophosphatémiant précoce de plusieurs hormones, ACTH, adrénaline, insuline, glucagon, et de GH en particulier, qui activent

le métabolisme cellulaire sans être directement impliquées dans le métabolisme phosphocalcique.

L'intervention de GH dans le métabolisme phosphaté ayant pour résultat global une épargne de l'ion phosphate, l'hormone s'oppose sur ce point à la parathormone. L'hypophosphatémie précoce jointe à la diminution de la phosphaturie correspondent à une captation cellulaire accrue de l'anion puisque dans les mêmes conditions l'hormone ne touche pas le métabolisme calcique.

En conclusion GH ne peut être présentée comme le facteur tendant à élever la phosphatémie de façon rapide, tout en intervenant précocement dans le métabolisme des phosphates¹⁶.

¹⁰ A. VÉZINHET, J. CHARRIER et L. DAUZIER, *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.* 12, 431 (1972).

¹¹ N. I. SWISLOCKI et C. M. SZEGO, *Endocrinology* 76, 665 (1965).

¹² S. NATELSON, J. B. PINCUS et G. RANAZZI, *Clin. Chem.* 9, 31 (1963).

¹³ J. SACKS et F. M. SINEX, *Am. J. Physiol.* 175, 353 (1953).

¹⁴ H. COPP, in *Phosphate et Métabolisme phosphocalcique* (Ed. D. J. HICO, L'expansion scientifique française, Paris 1971), p. 111.

¹⁵ R. W. MARSHALL et B. E. C. NORDIN, in *Phosphate et Métabolisme phosphocalcique* (Ed. D. J. HICO, L'expansion scientifique française, Paris 1971), p. 127.

¹⁶ Remerciements. L'hormone de croissance utilisée dans cette expérimentation nous a été gracieusement fournie par le NIAMD.

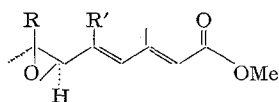
Juvenile Hormone Active Principle in *Attacus atlas* L.¹

P. PAGUIA⁸, P. MASNER⁹, K.-H. TRAUTMANN⁹ and A. SCHULER⁹

Department of Entomology, University of the Philippines, Los Baños (Philippines), and Biological Laboratories, Dr. R. Maag Ltd., CH-8157 Dielsdorf (Switzerland), 16 July 1975.

Summary. The ether extract of *Attacus atlas* L., subjected to an isotope dilution method for the determination of known insect juvenile hormones, revealed the presence of an active substance which has a similar chromatographic behaviour with the known JH-3, methyl (2E, 6E)-10, 11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2, 6-dodecadienoate.

The ether extracts of *Attacus atlas* L. were found to have morphogenetic and ovicidal activity on corn borer, *Ostrinia furnacalis* GUENÉE². To determine whether this activity corresponds to one of the three known juvenile hormones (JH 1-3) or not, the ether extract was subjected to an isotope dilution method, which allows the qualitative and quantitative determination of all naturally occurring insect juvenile hormones³ as yet known. The



JH 1: R = R' = ethyl

JH-2: R = ethyl, R' = methyl

JH-3: R = R' = methyl

biological activity of the ether extract and fractions from all consecutive purification steps were determined, using the *Galleria* wax test⁴. The results, expressed in *Galleria* units (GU) as well as the quantitative biological estimates of juvenile hormone aliquots, were obtained using the standard values of 1.6 and 70 pg JH-1 and JH-3, respectively for a GU.

The lipid extract of 100 *A. atlas*⁵ moths (11.9 g) was found to be highly biologically active (total 134,357 GU; Table). Its specific activity of 88 µg/GU is comparable to that of *Platysamia cecropia* (35 µg/GU)⁶. After each of

the 3 first purification steps, the main biological activity was found in the fraction containing JH radioactive material. Likewise, a certain amount of bioactivity was also found in non-radioactive fractions. This activity, however, is attributed to the loss of material which naturally occurs in this procedure, substantiated with the radioactive yield of 51%.

After the column chromatography procedure, a first TLC purification employing plates of 0.5 and 0.25 mm thickness, consecutively, was carried out. The bioactive fraction corresponding to JH-1 to JH-3 was found to contain 46,689 GU. The loss of intrinsic activity is similar to the 51% yield of added radioactive JH mentioned above⁷. The rest of the TLC fractions was also bioassayed, but was found inactive.

¹ The work was supported as a research training by Dr. R. MAAG Ltd., CH-8157 Dielsdorf, Switzerland.

² P. PAGUIA, Master's Thesis, University of the Philippines at Los Baños, Philippines.

³ K.-H. TRAUTMANN, A. SCHULER, M. SUCHÝ and H.-K. WIPF, *Z. Naturforsch.* 29, 161 (1974).

⁴ J. D. DE WILDE, G. B. STAAL, C. A. D. DE KORT, A. DE LOOF and G. BAARD, *Proc. K. med. Akad. Wet. Ser. C* 77, 321 (1968).

⁵ Courtesy of Dr. BELEN MORALLO-REYES, Asst. Prof., Dept. of Entomology College of Agriculture, University of the Philippines at Los Baños.

⁶ K.-H. TRAUTMANN and P. MASNER, unpublished results.

⁷ H. ROELLER and J. S. BJERKE, *Life Sci.* 4, 1617 (1965).