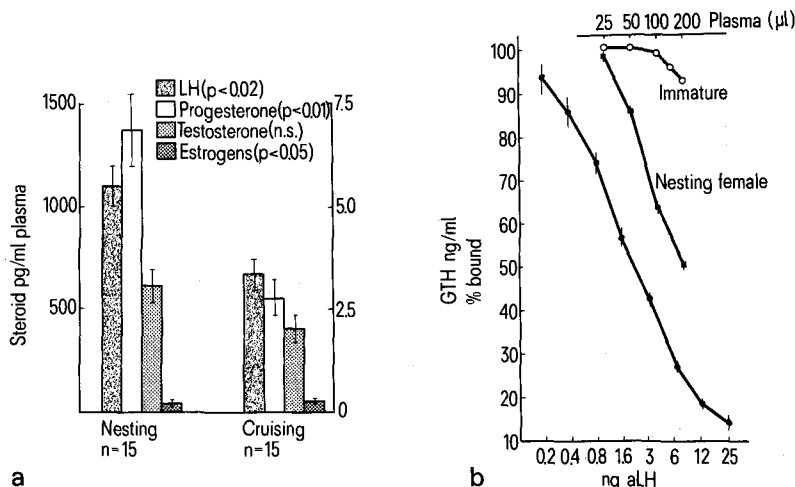




a Plasma levels of GTH, progesterone, testosterone and total estrogens in nesting and cruising green sea turtles. **b** Cross reaction of plasma from nesting *Chelonia mydas* (■) and plasma from immature *C. mydas* (○), sex not known, as compared to purified chicken LH, fraction AE1, (●).

the nesting phase than during the cruising phase. Testosterone does not change significantly, but total estrogens appears lower (20 ± 7 pg/ml) during the nesting than the cruising (44 ± 7 pg/ml) phase.

The ovarian cycle of *C. mydas* is not known. Behavioral observations (Owens, unpublished) indicate that there is a short (1 week) period of estrus during which mating occurs. A period of about 1 month, during which advances by males are repulsed, elapses before the 1st nesting occurs. During the nesting period up to 10 clutches (mean = 6) of

from 70-212 (mean = 120) eggs may be laid at 12-14-day intervals³. No blood samples were available from animals in estrus or in the period prior to the 1st nesting, but from what we know of the hormonal changes occurring during the annual ovarian cycle of *Chrysemys picta*⁴, in which similar high levels of plasma testosterone occur, it is likely that peak estrogen levels in *C. mydas* probably occur prior to the 1st nesting period and that successive clutches require only slight increases in estrogen to stimulate continued vitellogenin synthesis.

- 1 Department of Zoology and Physiology, LSU, Baton Rouge, LA 70803, USA.
- 2 Department of Biology, Texas A & M University, College Station, TX 77843, USA.
- 3 T.P. Rebel, in: Sea Turtles. University of Miami Press, Coral Gables, Florida 1976.
- 4 V. Lance, C. Scanes and I.P. Callard, Gen. comp. Endocr. 31, 435 (1977).
- 5 D.W. Owens, J.R. Hendrickson, V. Lance and I.P. Callard, Herpetologica 34, 270 (1978).
- 6 I.P. Callard, V. Lance, A.R. Salahanick and D. Barad, Gen. comp. Endocr. 35, 254 (1978).
- 7 B.K. Follett, C.G. Scanes and F.J. Cunningham, J. Endocr. 52, 545 (1972).
- 8 C.G. Scanes, B.K. Follett and H.J.Th. Goos, Gen. comp. Endocr. 19, 596 (1972).
- 9 I.P. Callard and V. Lance, in: Reproduction and Evolution, p.133. Ed. J.H. Calaby and C.H. Tyndale-Biscoe. Australian Academy of Sciences, Canberra 1977.

Variations des taux d'ecdystéroïdes au cours du développement de *Bombyx mori*; rapport entre ces variations et les phases de croissance et de morphogénèse

Variations of ecdysteroid content during *Bombyx mori* development; relation to growth and morphogenetic phases

M. Coulon, B. Calvez, M. De Reggi, J.M. Legay et M. Hirn

Département de Biologie Générale et Appliquée, Université Claude Bernard, Laboratoire Associé au CNRS N°243, 43, bd du 11 Novembre 1918, F-69621 Villeurbanne (France), et Centre d'Immunologie de Marseille Lumigny, CNRS, 70, rue Léon Lachamp, F-13288 Marseille (France), 2 octobre 1978

Summary. During the development of *Bombyx mori* (monovoltin race) ecdysteroid levels were determined in oocytes, eggs, and haemolymph of larvae, and in the haemolymph of pupae. In haemolymph, the only RIA reactive materials are ecdysone and ecdysterone. In oocytes and eggs, other ecdysteroids are also detected. During larval instars, the ecdysteroid levels are low whereas they are very high during morphogenetic periods. During embryonic diapause, the ecdysone titer decreases during the cessation of morphogenesis.

Les taux d'ecdystéroïdes ont été déterminés dans de nombreux groupes d'insectes. Cependant les données sont disparates; chaque insecte n'a été examiné qu'au cours d'une partie de son cycle de développement¹⁻¹³; les dosages sont effectués par des techniques différentes: tests biologiques^{1,3,4,9,10,13}, dosages radioimmunologiques^{2,8,11,12}, chromatographie en phase gazeuse et fragmentographie de

masse⁵⁻⁷. A partir de ces travaux il est donc difficile d'obtenir une vue générale de l'importance relative des ecdystéroïdes dans chaque phase du cycle de développement des insectes.

Par contre, chez un Lépidoptère, *Bombyx mori*, les variations du taux d'ecdystéroïdes ont été analysées au cours de toutes les phases importantes du développement: oocytes

en formation¹⁴, œuf¹⁵, stades larvaires^{11,16}, nymphe¹¹. Une même méthode radioimmunologique (RIA) a été utilisée. Ces travaux permettent donc de suivre l'évolution du taux d'ecdystéroïdes pendant tout le cycle vital du ver à soie. Ils permettent en outre de comparer les données obtenues durant les phases caractérisées surtout par une croissance quantitative de l'insecte et celles dominées par d'intenses processus morphogénétiques.

Matériel et méthodes. Le travail expérimental est effectué sur une vace monovoltine européenne (200×300); l'ensemble des échantillons provient d'élevages standardisés synchrones. L'extraction des ecdystéroïdes et leur dosage sont pratiqués suivant la méthode de De Reggi et al.¹⁷. Dans l'hémolymphe des larves et des pupes, l'activité RIA se limite à l'ecdysone et l'ecdystérone; par contre dans les ovocytes et les œufs d'autres ecdystéroïdes sont plus abondants¹⁸⁻²¹.

Résultats. 1. La teneur en ecdystéroïdes de chaque ovocyte suit un cycle propre de variations au cours de sa maturation dans l'ovaire (chez *Bombyx mori* les ovocytes se développent presque exclusivement au stade nymphal). La teneur en ecdystéroïdes est élevée pendant toute la maturation; elle atteint à son maximum 8 pmoles/mg de poids frais, puis diminue jusqu'à 0,8 pmoles/mg.

2. Après la ponte, le début de l'embryogenèse se caractérise chez ce monovoltin par une forte augmentation du taux d'ecdystéroïdes dans l'œuf. La diapause qui intervient au stade bandelette embryonnaire s'accompagne d'un taux faible. Après élimination de la diapause, la suite du développement s'effectue au contraire en présence d'un taux élevé de ces hormones (de l'ordre de 8 pmoles/mg); des dosages effectués après dissection de l'œuf embryonné

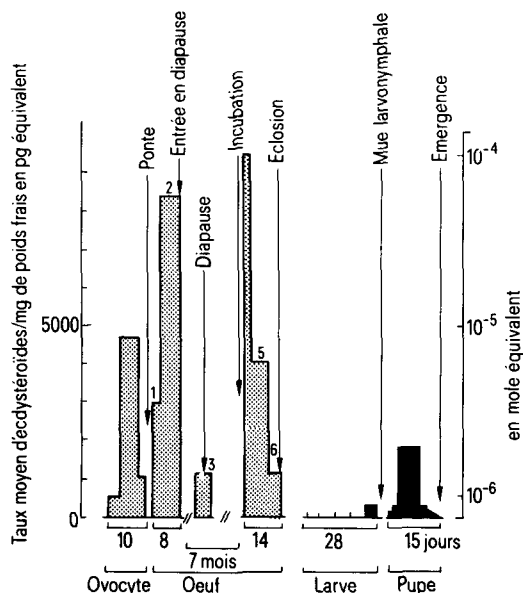
montre que les ecdystéroïdes pour leur majeure partie sont situés dans l'ensemble vitellus-séreuse. Chez la prélarve, c'est-à-dire dans les stades postérieurs à la mue embryonnaire, alors que le vitellus et la séreuse sont ingérés, le taux d'ecdystéroïdes chute.

3. Les stades larvaires sont caractérisés par un taux très faible d'ecdysones circulantes pendant la plus grande partie de leur déroulement. Un pic hormonal très bref est observé aux 4 premiers stades lors des toutes dernières heures d'alimentation; il chute dès l'entrée en mue. La valeur de ce pic augmente peu d'un stade à l'autre s'il est rapporté à l'unité de poids frais (0,17 pmoles/mg au 1er stade, 0,35 pmoles/mg au 4e). Le dernier stade larvaire présente des caractéristiques particulières: le pic précédent la mue larvonymphale apparaît pendant une période de jeûne (filage), il est plus étalé dans le temps et plus ample (0,30 à 0,54 pmoles/mg de poids frais).

4. Chez la nymphe, le taux d'ecdysones circulantes est incomparablement plus important. Il est supérieur à 0,6 pmoles/mg de poids frais pendant 5 jours; le maximum atteint 3,6 pmoles/mg de poids frais.

Interprétation - conclusion. 1. Les maxima de concentration des ecdystéroïdes marquent les principaux événements du cycle de développement. L'enveloppe des maxima partiels est une courbe simple interrompue seulement par la diapause. 2. La vie larvaire qui représente essentiellement une phase de croissance massive (le poids de la larve est multiplié par 10000), la diapause durant laquelle les processus morphogénétiques sont apparemment bloqués, se déroulent en présence d'un faible taux d'ecdystéroïdes. 3. Qu'il s'agisse de la maturation de l'ovocyte, du développement embryonnaire, de la période prénymphale, toutes ces phases au cours desquelles se réalisent d'important phénomènes morphogénétiques sont caractérisées par la présence prolongée d'un taux très élevé d'ecdystéroïdes. En particulier, il est remarquable que les processus fondamentaux de mise en place du nouvel organisme (morphogenèse de la bandelette embryonnaire) se fassent dans un milieu présentant la plus forte concentration en ecdystéroïdes, de toutes les phases du développement de *Bombyx mori*. 4. La concentration des ecdystéroïdes peut varier dans de fortes proportions dans un milieu clos, c'est-à-dire pendant des périodes où aucun échanges nutritionnel n'est possible avec le milieu extérieur. Ce phénomène est particulièrement évident pour la nymphe et ultérieurement pour l'œuf.

La mise en parallèle des différentes phases du développement de *Bombyx mori* et de l'évolution du taux d'ecdystéroïdes conduit à poser un certain nombre de questions, nous en retiendrons 3 ici. Chez *Locusta*²² il est démontré que les cellules folliculaires assurent la synthèse des ecdystéroïdes accumulés dans l'ovocyte. Chez *Bombyx* il semble bien que l'ovaire soit capable de synthétiser ces substances¹³ (Lamy-Coulon, en préparation), mais le développement ovocytaire s'effectuant dans des conditions différentes (ovariole méroïstique polytrophique) on peut se demander quelle relation existe entre les différentes phases d'accroissement ou de maturation et l'activité synthétique des cellules folliculaires. Dans l'œuf, les variations de la teneur relative des différents ecdystéroïdes peuvent être mise en relation d'une part avec les modifications du métabolisme de diapause, d'autre part avec celles relevant des phases successives de la morphogenèse; ces deux dernières hypothèses sont à étudier.



Taux moyen d'ecdystéroïdes en fonction du développement de *Bombyx mori*. En abscisse sont portées les durées pendant lesquelles chacun des taux sont enregistrés. En ordonnée sont portés les taux moyens d'ecdystéroïdes rapportés à l'unité de poids frais. Larves et pupes: dosage RIA dans l'hémolymphe. Dans ces 2 cas, ecdysone et ecdystérone sont principalement dosés (■). Ovocyte: dosage RIA sur l'ovocyte in toto. Œuf: dosage RIA sur l'ensemble vitellus + séreuse + embryon. Prélarve: dosage RIA de l'embryon ayant ingéré vitellus + séreuse. Dans ces 3 cas plusieurs types d'ecdystéroïdes sont dosés¹⁷⁻²⁰ (▨).

1: Formation de la blastule. 2: Morphogenèse de la bandelette embryonnaire. 3: Diapause. 4: Début de la formation du stomodéum et du proctodéum. 5: Embryogenèse (stades suivants). 6: Prélarve.

1 P. Karlson et E. Shaaya, J. Insect Physiol. 10, 797 (1964).

2 D.W. Borst et J.D. O'Connor, Science 178, 418 (1972).

3 J.A. Hoffmann, J. Koolman, P. Karlson et P. Joly, Gen. comp. Endocr. 22, 90 (1973).

4 F. Schaller et J.A. Hoffmann, C. r. Acad. Sci. Paris 277, 741 (1973).

- 5 J.P. Delbecq, M. Prost, B.F. Maume, J. Delachambre, R. Lafont et B. Mauchamp, C. r. Acad. Sci. Paris 281, 309 (1975).
- 6 A. Bouthier, J.L. Penetier, B. Mauchamp et R. Lafont, C. r. Acad. Sci. Paris 280, 1837 (1975).
- 7 R. Lafont, B. Mauchamp, C. Blais et J.L. Penetier, J. Insect Physiol. 23, 277 (1977).
- 8 B. Calvez, C. r. Acad. Sci. Paris 282, 1367 (1976).
- 9 M. Lagueux, J.M. Perron et J.A. Hoffmann, J. Insect Physiol. 22, 57 (1976).
- 10 N.L. Young et P.R. Young, Insect. Biochem. 6, 169 (1976).
- 11 B. Calvez, M. Hirn et M. De Reggi, FEBS Letters 71, 57 (1976).
- 12 R.B. Hodgetts, B. Sage et J.D. O'Connor, Devl Biol. 60, 310 (1978).
- 13 J.A. Hanaoka et E. Ohnishi, J. Insect Physiol. 20, 2375 (1974).
- 14 J.M. Legay, B. Calvez, M. Hirn et M. De Reggi, Nature 262, 489 (1976).
- 15 M. Hirn, M. Coulon et M. De Reggi, C. r. Acad. Sci. Paris 284, 2147 (1977).
- 16 M. Coulon, Devl Growth Differ. 19, 181 (1977).
- 17 M.L. De Reggi, M.H. Hirn, M.A. Delaage, Biochem. biophys. Res. Commun. 66, 1307 (1975).
- 18 M. Hirn, Thèse Etat Marseille, sous presse.
- 19 C. Hetru, M. Lagueux et J.A. Hoffmann, Life Sci., sous presse.
- 20 J.N. Kaplanis, W.E. Robbins, M.J. Thompson et S.R. Dutry, Science 180, 307 (1973).
- 21 T. Mizumo et E. Ohnishi, Devl Growth Differ. 17, 219 (1975).
- 22 M. Lagueux, Thèse, Etat Strasbourg, 1978.

Glycogen contents in the rat uterus: Response to *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. extracts¹

Anand O. Prakash²

School of Studies in Zoology, Jiwaji University, Gwalior 474002 (India), 22 September 1978

Summary. Ethanolic extracts (50%), as well the benzene extracts, of *H. rosa-sinensis* Linn. have reduced significantly the glycogen contents in the uterus of adult rat. Both the extracts exhibit a clear-cut dose-response relation. The inhibition in glycogen contents increases as the dose is increased. Of the 2, benzene extract seems to be more potent. The results are due to antiestrogenic nature of the extracts.

Contraceptive property of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. (flowers) reported by Batta and Santhakumari³ has been confirmed in rats⁴⁻⁷. In view of the antiestrogenic activity of 50% ethanolic and benzene extracts⁸, the present communication deals with their effect on uterine glycogen contents in adult rats.

Materials and methods. 50% ethanolic and benzene extracts of *H. rosa-sinensis* (flowers) were obtained by soxhlet apparatus as described earlier⁶. Dried extracts were separately macerated with gum acacia suspended in distilled water at doses of 75, 150 and 300 mg/kg b. wt.

Colony-bred Swiss adult female rats, 3-4 months old (165±15 g), were maintained under uniform husbandry conditions and were given 'Hindustan Lever' palletted diet and water ad libitum. The vaginal smear of each rat was examined daily for 18 days to select animals of regular cycles. The rats showing proestrus stage were selected and divided into 4 groups separately for each extract. Each dose was administered orally for 6 days (1 complete cycle), 12 days (2 complete cycles) and 18 days (3 complete cycles) to different groups of adult rats (table). Control rats in each group received vehicle only in a similar manner. Vaginal smear of each rat was examined daily in the morning. The animals were sacrificed in diestrus stage and 48 h after the last dose, i.e. on 8th, 14th and 20th day respectively. The uteri carefully dissected out, trimmed, blotted on filter

paper and weighed quickly to the nearest 0.1 mg and processed for glycogen estimation using anthrone reagent method⁹. The results were statistically analyzed using analysis of variance.

Results. The table shows the results. 1. 50% ethanolic extract. It reduces the uterine glycogen contents in rats significantly. The effect depends upon the dose and the period of treatment; 75 mg/kg dose is only effective to decrease the glycogen contents when administered for 18 days (vs. control $p < 0.01$). Similarly, 150 mg/kg dose when applied for 12 and 18 days reduces the glycogen concentration significantly (vs. respective control $p < 0.02$ and < 0.01); 300 mg/kg dose is effective at every schedule, but it is highly significant at 18 days schedule (vs. control $p < 0.001$). Interestingly, every dose is statistically significant at 18 days level (vs. control $p < 0.01$, < 0.001).

2. Benzene extract. It exhibits more consistent results, where the inhibition in glycogen contents is highly significant. The effect is dose- and duration-dependent. The suppression in glycogen concentration increases as the dose is increased. 75 mg/kg dose reduces the glycogen contents when administered for 18 days only (vs. control $p < 0.005$). Both 150 and 300 mg/kg doses are significant to reduce the uterine glycogen contents when applied at any of the 3 schedules; however, the activity is highly significant at 18 days level (vs. control $p < 0.001$).

Effect of 50% ethanolic and benzene extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. on uterine glycogen in adult rats

Extract	Dose (mg/kg/day)	Treatment period (days)		
		6	12	18
Control (vehicle only)	-	34.72 ± 1.58* (5)	37.90 ± 1.37 (4)	36.54 ± 1.59 (5)
50% ethanolic	75	32.76 ± 1.54 (5)	33.20 ± 1.36 (5)	28.07 ± 1.56 ^c (4)
	150	31.27 ± 1.56 (4)	29.47 ± 2.44 ^d (4)	25.48 ± 1.64 ^c (5)
	300	24.70 ± 3.00 ^c (5)	21.86 ± 2.00 ^a (5)	20.10 ± 1.78 ^a (5)
Control (vehicle only)	-	35.95 ± 1.24 (4)	32.92 ± 1.17 (4)	38.38 ± 1.42 (5)
Benzene	75	30.15 ± 1.63 (4)	29.95 ± 1.19 (4)	26.92 ± 1.18 ^b (4)
	150	28.60 ± 1.55 ^d (5)	25.25 ± 1.52 ^d (4)	22.88 ± 1.94 ^a (5)
	300	22.20 ± 1.93 ^b (4)	18.40 ± 1.39 ^a (4)	18.40 ± 1.24 ^a (5)

* Values are mean ± SE. Number of rats used in parentheses. p-Values vs. their respective controls: ^a < 0.001 ; ^b < 0.005 ; ^c < 0.01 ; ^d < 0.02 .