

The crude mitochondrial fraction, which was subjected to osmotic shock, was resuspended in 0.32 M sucrose and subfractionated on a discontinuous sucrose density gradient (50,000×g, 1 h). The layer which formed at the interface between 0.8 M and 1.0 M sucrose was used as the synaptic membrane fraction. The enzyme activity and protein content were measured by the methods of Ellman et al.¹⁰ and Lowry et al.¹¹ respectively.

Results and discussion. The histochemical reaction of AChE in chick embryo optic lobe increased rapidly between stages 42 and 44, and this increase was especially remarkable in the neuropile of the tectum and the mesencephalic nuclei. In the tectum, the reaction of the neuronal cell bodies can be recognized in all the layers at stage 42; however, it is obscured by the more intense reaction in the neuropile of the various layers, with the exception of the stratum griseum centrale, at stage 44 (figure 1, a and b). In the nucleus isthmi pars magnocellularis, also, the more intense reaction of the enzyme in the neuropile at stage 45 compared with that at stage 42 is noticeable (figure 1, c and d). These results, specially in the tectum, are the same as those which Filogamo⁶ observed. The point to notice in particular is that the reaction in the neuropile increases as development proceeds.

On the other hand, the biochemical activity of AChE in the optic lobe rose gradually from about stage 40 to hatching, in the microsomal fraction, while that in the synaptic membrane fraction (SM) rose rapidly from about stage 44 to hatching (figure 2, a). Namely, the increase of the AChE activity in the SM fraction was found at later stages than that in the microsomal fraction. The increase in the protein content in the optic lobe SM fraction also occurred at a later stage than that in the microsomal fraction (figure 2, b). The biochemical activity in the microsomal fraction and the SM fraction can be considered as reflecting the enzyme levels within the cell body and synaptic site. So the changes of AChE activity in the subcellular fractions of the chick embryo optic lobe are consistent with the concept that AChE is synthesized primarily in the cytoplasm of the

neuronal cell body, and is then transported to the synaptic site by axonal flow. This concept has been suggested by Austin et al.¹² on the basis of the rates of regeneration of AChE in rat subcellular fractions following DFP inhibition. The change in protein content in the subcellular fractions reveals that other proteins are also transported by axonal flow. It is also possible to consider that the histochemical reaction of AChE in the neuropile is due to the enzyme activity of a neuronal network which contains synaptic contacts. Accordingly, the increase in the histochemical reaction of AChE in the neuropile of the developing chick optic lobe can be interpreted as the result of the transport of the enzyme from the cytoplasm of the neuronal cell body to the synaptic site.

- 1 Acknowledgments. The authors wish to thank Prof. Yasuharu Kuwahara, Cataract Research Institute, for the use of his cryostat and other laboratory facilities, Dr. Koji Kami, Department of Anatomy, Keio University School of Medicine, for his valuable advice regarding histochemistry.
- 2 A. Contestabile, *Experientia* 32, 1223 (1976).
- 3 A. Contestabile, M. Ercolessi and A. Bellucci, *Experientia* 34, 759 (1978).
- 4 F. Ciani, A. Contestabile and L. Villani, *Histochemistry* 59, 81 (1978).
- 5 E. J. Boell, P. Greenfield and S. C. Shen, *J. exp. Zool.* 129, 415 (1955).
- 6 G. Filogamo, *Archs Biol.* 71, 159 (1960).
- 7 V. Hamburger and H. L. Hamilton, *J. Morph.* 88, 49 (1951).
- 8 M. J. Karnovsky and L. Roots, *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219 (1964).
- 9 T. Inoue, D. S. Deshmukh and R. A. Pieringer, *J. biol. Chem.* 246, 5695 (1971).
- 10 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. and R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmac.* 7, 88 (1961).
- 11 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. Farr and R. J. Randall, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 12 L. Austin and K. A. James, *J. Neurochem.* 17, 705 (1970).

La croissance cellulaire de quelques tissus au cours des trois derniers stades larvaires de *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae)

The cellular growth of certain tissues in last three instar larvae of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae)

T. Srihari¹

Laboratoire de Physiologie des Insectes, Université de Paris, Paris (France), 5 avril 1979

Summary. The cellular growth of certain tissues in last 3 instar larvae of *Pieris brassicae* L. was studied in relation to moult, body growth and also with variations in the size of prothoracic gland.

Trager^{2,3} a étudié d'une façon détaillée la croissance cellulaire chez *Lucilia sericata*, *Bombyx mori* et *Aedes aegypti* en relation avec la croissance de l'animal. Il montre que toute la croissance larvaire chez *Lucilia sericata* est due à une augmentation de la taille des cellules et non à une multiplication de celles-ci. Par contre, chez *B. mori* et *Ae. aegypti*, certains tissus subissent une croissance cellulaire, d'autres une multiplication cellulaire. La croissance se fait de 2 façons: elle peut être proportionnelle à l'augmentation de la taille du corps ou bien être plus rapide que celle-ci. La taille des cellules qui se multiplient augmente proportionnellement moins rapidement que la taille du corps. Les résultats obtenus conduisent Trager à l'hypothèse suivante: les tissus larvaires qui s'histolysent entièrement durant la nymphose tendent à croître par une augmentation de taille

de leurs cellules, tandis que ceux qui persistent jusqu'à l'imago croissent par multiplication cellulaire. Plusieurs auteurs ont également confirmé cette hypothèse⁴⁻⁸. Cependant ce type de croissance n'a été étudié que par quelques auteurs^{9,10}. Nous traitons ce problème au cours des 3 derniers stades larvaires de *Pieris brassicae*, analysant la consommation de la nourriture, la croissance pondérale et linéaire, la surface interne de l'intestin moyen et la croissance des cellules épithéliales de l'intestin moyen, des cellules du corps gras, des cellules épidermiques et des oenocytes.

Matériel et méthodes: Les chenilles ont été élevées selon les techniques habituelles^{11,12}. Pour les observations histologiques, le premier segment abdominal des chenilles à divers stades est fixé au Bouin et inclus à la paraffine, les coupes de

Tableau 1. Taille de cellules de divers tissus (en μm^2) au cours des 3 derniers stades larvaires de *Pieris brassicae* L. (erreur standard de la moyenne est indiqué entre parenthèses).

Stades larvaires	Jours	Cellules épidermiques	Oenocytes	Cellules du corps gras	Cellules épithéliales de l'intestin moyen	Surface interne de l'intestin moyen (en coupe transversale)
3e	0	21,5 (1,3)	180,3 (12,4)	16,3 (0,9)	119,6 (7,6)	434,2 (7,8)
3e	1	18,9 (1,0)	255,6 (13,6)	36,4 (3,8)	87,2 (3,9)	1881,5 (13,1)
3e	2	26,3 (2,3)	209,5 (14,7)	42,0 (3,0)	112,3 (4,3)	1450,0 (23,6)
4e	0	17,9 (0,7)	229,5 (19,2)	40,5 (3,5)	120,8 (6,2)	1326,3 (7,8)
4e	1	26,9 (1,5)	283,8 (12,6)	45,3 (2,3)	108,6 (6,3)	3836,0 (63,1)
4e	2	24,2 (1,2)	228,6 (10,2)	46,8 (3,2)	106,8 (4,8)	2265,0 (13,1)
5e	0	17,7 (0,4)	274,7 (14,8)	38,3 (2,6)	84,1 (4,9)	4521,0 (92,1)
5e	1	28,6 (1,3)	496,1 (25,6)	54,1 (3,3)	116,4 (4,5)	13730,0 (286,8)
5e	2	29,5 (1,5)	453,7 (24,8)	90,3 (6,0)	131,7 (5,6)	12623,0 (181,5)
5e	3	27,3 (1,1)	705,6 (43,9)	144,9 (13,3)	106,3 (5,7)	12376,0 (368,4)
5e	4	-	462,9 (31,3)	120,9 (9,9)	-	-

Tableau 2. Coefficients de corrélations (réciproques) pour des 3 derniers stades larvaires de *Pieris brassicae* L.

X/Y	Poids de l'animal	Longueur de l'animal	Longueur du 1er segment abdominal	Largeur du 1er segment abdominal	Taille de la glande prothoracique	Poids de la nourriture consommée
Taille des cellules épidermiques	0,71	0,75	0,77	0,66	0,63	0,73
Taille des oenocytes	0,91	0,85	0,88	0,86	0,93	0,79
Taille des cellules du corps gras	0,89	0,75	0,82	0,86	0,87	0,62
Taille des cellules épithéliales de l'intestin moyen	0,35	0,30	0,31	0,23	0,20	0,67

5 μm d'épaisseur sont colorées à l'Azan et hématoxyline-éosine. Les observations microscopiques et les dessins à la chambre claire des cellules de divers tissus ont été faits à l'aide d'un microscope Wild. La surface des cellules est ensuite déterminée sur les dessins à l'aide d'un planimètre (G. Coradi, Zurich). Pour chaque observation on a étudié un minimum de 200 cellules de chaque type. Les cellules épithéliales de l'intestin moyen ont été mesurées partie apicale (bordure en brosse) incluse.

Résultats et discussion: Les résultats (tableaux 1 et 2) indiquent que les cellules épidermiques subissent certaines variations de taille au cours de la période d'intermue. Ceci est compréhensible, du fait que la cuticule de la chenille au niveau thoracique et abdominal reste molle et permet dans une certaine mesure ces variations. Les cellules épidermiques se multiplient lors de la mue larvaire, cette multiplication s'accompagne d'une diminution de leur taille. Les cellules épidermiques augmentent de taille durant la première moitié des 4e et 5e stades larvaires, et puis diminuent au cours de la 2e moitié, indépendamment de mitoses. Les cellules du corps gras diminuent aussi après chaque mue larvaire mais très peu par rapport aux cellules épidermiques; en revanche les oenocytes augmentent considérablement de taille après la mue. La taille des cellules du corps s'accroît considérablement au cours du dernier stade larvaire: cependant elle commence à diminuer au cours du dernier jour de la vie larvaire, au moment où les phénomènes de la métamorphose débutent.

La taille des oenocytes augmente durant la première moitié des 3e et 4e stades larvaires et diminue durant la 2e moitié. C'est au cours du 5e stade larvaire que ces cellules augmentent le plus; les cellules de l'épithélium de l'intestin moyen subissent des petites variations au cours de la croissance larvaire. La surface interne de l'intestin moyen augmente d'un stade à l'autre mais elle prend son importance maximum au cours du dernier stade larvaire. On constate une très forte corrélation entre la surface interne de l'intestin moyen (en coupe transversale) et le poids de la nourriture consommée ($r=0.90$): par contre cette surface interne de l'intestin moyen ne présente aucune corrélation avec le poids de la nourriture utilisée¹¹ ($r=0.41$). En ce qui concerne la taille des cellules épithéliales de l'intestin moyen, aucune corrélation significative n'a pu être établie avec les différentes variables envisagées sauf avec le poids de la nourriture consommée (tableau 2). Le taux d'utilisation de la nourriture consommée ne dépend donc pas seulement de la surface disponible mais aussi de l'efficacité d'absorption de la nourriture digérée. Les cellules du corps et les oenocytes dont la taille augmente montrent une corrélation plus étroite avec le poids et la taille de l'animal et la taille de la glande prothoracique que les cellules épidermiques qui croissent par multiplication (tableau 2). Il y a lieu de signaler qu'au cours des 3 derniers stades larvaires, les variations de la taille des oenocytes sont plus étroitement liées à celles de la glande prothoracique¹³. L'importance physiologique de ce lien reste à éclaircir.

1 Adresse actuelle: Universität Konstanz, Fachbereich Biologie, Postfach 733, D-775 Konstanz, Federal Republic of Germany.
2 W. Trager, J. exp. Zool. 71, 489 (1935a).
3 W. Trager, J. exp. Zool. 76, 467 (1937).
4 W. F. Abercrombie, J. Morph. 59, 91 (1936).
5 D. Ludwig et W. F. Abercrombie, J. Morph. 59, 113 (1936).
6 D. Bodenstein, dans: Biology of Drosophila. M. Demerec, Paris 1950.

7 F. W. Robertson, Genetics 44, 869 (1959).
8 G. R. Wyatt et B. Linzen, J. Insect Physiol. 11, 259 (1965).
9 M. Guillaume, Bull. Soc. Zool. Fr. 136, 361 (1961).
10 H. A. Schneiderman et L. I. Gilbert, Science 143, 325 (1964).
11 T. Srihari, Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.) 6, 1003 (1970).
12 T. Srihari, Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.) 8, 359 (1972).
13 A. Karlinsky et T. Srihari, Bull. Soc. Zool. Fr. 98, 243 (1973).