

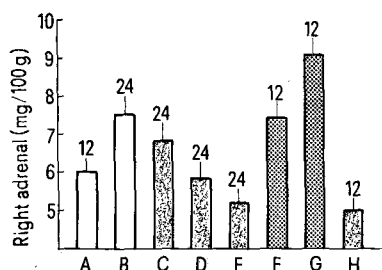
without effect on CAH. However, when injected into the 3rd ventricle, the concentration of 0.00001 pg AVT/ $\mu$ l, corresponding to only 6000 molecules AVT/ $\mu$ l, completely prevented CAH. Since the total volume of injections was 2  $\mu$ l, this corresponds to 12,000 molecules AVT/mouse. To our knowledge, this represents the lowest concentration so far reported for an active biological substance able to produce an endocrine effect. In the range tested, the effect of AVT appears to be dose-dependent since 0.000001 pg AVT/ $\mu$ l only partially inhibited CAH, whereas 0.001 pg AVT/ $\mu$ l produced adrenal atrophy. Excepting the mice from group C (Figure), statistical analysis indicates a highly significant difference between the adrenal weights of mice injected with AVT intrapituitarily and intraventricularly ( $p < 0.001$ ). There is now convincing evidence that unilateral adrenalectomy induces CAH by increasing ACTH secretion<sup>7</sup>, and that the pineal exerts an inhibitory influence on adrenal cortex through the suppression of ACTH<sup>8-11</sup>. Since AVT injected into the pituitary is without effect on CAH or, on the contrary, potentiates CAH, and since the presumed physiological site for AVT release from the pineal is the cerebrospinal fluid<sup>12,13</sup>, the present results, although indirect, strongly suggest that AVT injected into the 3rd cerebral ventricle of the mouse reversed CAH by inhibiting syn-

thesis and/or release of ACTH-releasing hormone. CAH inhibition by AVT is highly specific, because neither oxytocin, nor arginine vasopressin are able to inhibit CAH when injected into the 3rd ventricle of the mouse<sup>6</sup>. Since *in vitro* AVT has ACTH-releasing activity<sup>6</sup>, the potentiation of CAH by AVT injected into the pituitary probably represents an unspecific ACTH-releasing activity common to all basic octapeptides<sup>14</sup>. Indeed (GREIDANUS and DE WIED, personal communication), AVT given *i.v.* in chlorpromazine pentobarbital blocked rats, releases ACTH, suggesting that preventing AVT from exerting its inhibitory effects on ACTH-releasing hormone, it retained only its unspecific ACTH-releasing activity. Although the mechanism of action of such a small number of molecules cannot be explained at present, our results clearly demonstrate that the mammalian brain contains the most sensitive receptor for AVT so far described.

**Summary.** A single injection of 10 pg synthetic arginine vasotocin into the pituitary significantly potentiated adrenal hypertrophy produced in male mice by unilateral adrenalectomy, whereas the same concentration injected into the 3rd ventricle produced adrenal atrophy.

S. PAVEL<sup>15</sup>

*Institute of Endocrinology,  
Bucuresti (Romania), 8 March 1975.*



Effects of synthetic AVT injected into the pituitary and into the 3rd ventricle of the brain, on adrenal hypertrophy produced in male mice by unilateral adrenalectomy (UA). A, sham operated controls; B, UA + 2  $\mu$ l saline, 3rd ventricle; C, UA + 0.000001 pg AVT/ $\mu$ l, 3rd ventricle; D, UA + 0.00001 pg AVT/ $\mu$ l, 3rd ventricle; E, UA + 0.001 pg AVT/ $\mu$ l, 3rd ventricle; F, UA + 0.001 pg AVT/ $\mu$ l, anterior pituitary; G, UA + 10 pg AVT/ $\mu$ l, anterior pituitary; H, UA + 10 pg AVT/ $\mu$ l, 3rd ventricle. Numbers above bars indicate number of animals; vertical lines represent standard error of the mean.

<sup>7</sup> W. F. GANONG, in *The Hypothalamus* (Eds. L. MARTINI, M. MOTTA and E. FRASCHINI; Academic Press, New York 1970), p. 313.

<sup>8</sup> G. A. KINSON, B. SINGER and L. GRANT, *Gen. comp. Endocr.* 10, 447 (1968).

<sup>9</sup> M. MOTTA, O. SCHIAFFINI, F. PIVA and L. MARTINI in *The Pineal Gland* (Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME and J. KNIGHT; Churchill, Livingstone, London 1971), p. 279.

<sup>10</sup> M. K. VAUGHAN, G. M. VAUGHAN, R. J. REITER and B. BENSON, *Neuroendocrinology* 10, 139 (1972).

<sup>11</sup> K. L. DICKSON and D. L. HASTY, *Acta endocr., Copenh.* 70, 438 (1972).

<sup>12</sup> S. PAVEL, *Endocrinology* 89, 613 (1971).

<sup>13</sup> S. PAVEL, *Nature, Lond.* 246, 183 (1973).

<sup>14</sup> W. DOEPFNER, E. STÜRMER and B. BERDE, *Endocrinology* 72, 897 (1963).

<sup>15</sup> I should like to thank Prof. M. BODANSZKY, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, for the synthetic AVT.

## Effets de micro-doses de testostérone et de 5 $\alpha$ -DHT sur l'épididyme de lézard castré (*Lacerta vivipara* Jacquin) en culture organotypique

### Effects of Microdoses of Testosterone and 5 $\alpha$ -DHT on Castrated Lizard (*Lacerta vivipara* Jacquin) Epididymis Cultivated *in vitro*

Lors de précédentes études nous avons montré que l'épididyme de lézard castré pouvait être maintenu en culture organotypique sans changement appréciable pendant au moins 10 jours<sup>1</sup>. L'addition de testostérone, de 5  $\alpha$ -DHT (17  $\beta$ -hydroxy-5- $\alpha$ -androstane 3one), de 3  $\alpha$ -et de 3  $\beta$ -androstane-3 diol (5 $\alpha$ -androstane-3  $\alpha$ , 17  $\beta$ -diol et 5  $\alpha$ -androstane-3  $\beta$ , 17  $\beta$ -diol) au milieu de culture a conduit à une reprise d'activité de l'organe<sup>2,3</sup>; cependant les réponses obtenues (hypertrophie de l'épithélium et activité sécrétoire) avec chacune de ces hormones aux doses de 5  $\mu$ g/ml (20  $\mu$ M/ml) de milieu montrent des degrés différents: le 3  $\beta$ -androstane-3 diol et la 5  $\alpha$ -DHT sont les plus efficaces puis vient le 3  $\alpha$ -androstane-3 diol et enfin la testostérone. Nous nous sommes demandé à quoi pouvait tenir cet effet moindre de la testostérone.

La testostérone n'est-elle pas l'androgène actif chez cette espèce, ou bien la testostérone se métabolise-t-elle difficilement dans nos conditions expérimentales?

Pour répondre à la première question, nous avons éprouvé par la même méthode et aux mêmes doses un autre androgène également présent dans le testicule de lézard: l'androstène dione<sup>4</sup>. Cette hormone induit une

<sup>1</sup> A. GIGON, C. GATHIER et J. P. DUFAURE, *C. r. Acad. Sci., Paris* 276, 2391 (1973).

<sup>2</sup> A. GIGON, *C. r. Acad. Sci., Paris* 278, 2815 (1974).

<sup>3</sup> J. P. DUFAURE et A. GIGON, *Gen. comp. Endocr.*, accepté pour publication.

<sup>4</sup> C. LUPO DI PRISCO, G. CHIEFFI et G. DELRIO, *Experientia* 23, 73 (1967).

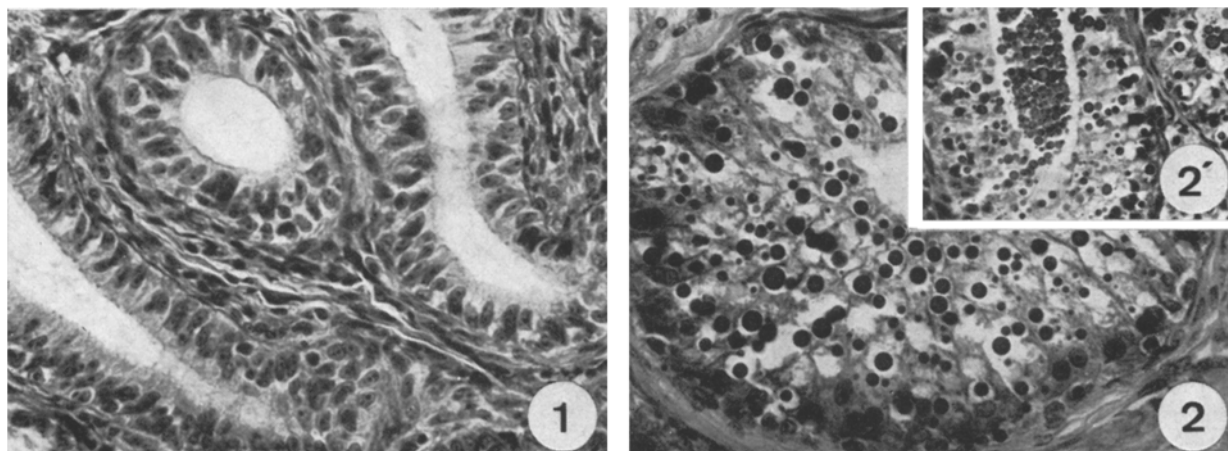


Fig. 1. Epididyme de lézard castré depuis 2 mois.  $\times 400$ .

Fig. 2 et 2'. Epididyme de lézard castré, cultivé pendant 23 jours en présence de 100 nM de testostérone/ml de milieu. 2,  $\times 400$ ; 2',  $\times 250$ .

stimulation d'un degré identique à celui obtenu en présence de testostérone (GIGON, résultats inédits). Afin de pouvoir répondre à la deuxième question, il était nécessaire d'éprouver d'autres doses car on ne peut exclure un effet toxique des hormones utilisées à des concentrations sans doute largement extraphysiologiques. Les résultats de FEYEL-CABANES et al.<sup>5</sup> obtenus sur la prostate de rat nous encourageaient dans ce sens. Aussi avons nous effectué de nouvelles séries de cultures avec de la testostérone et de la 5  $\alpha$ -DHT à des doses 200 fois moindres que dans nos précédentes expériences.

**Matériel et méthodes.** Les lézards (*Lacerta vivipara* Jacquin) récoltés à l'automne dans le Massif Central sont castrés bilatéralement dès leur arrivée au laboratoire. Les épидидymes sont prélevés 2 à 3 mois après la castration et mis en culture organotypique selon la technique précédemment décrite<sup>1</sup>. Les hormones, testostérone et 5  $\alpha$ -DHT, sont dissoutes dans le propylène-glycol (Merck) et rajoutées au milieu de culture après 24 h à raison de 25 ng/ml (100 nM/ml). Des cultures effectuées en milieu an hormonal mais avec propylène-glycol servent de témoin. Les explants sont cultivés pendant 23 jours ou 30 jours puis fixés au Bouin Hollande sublimé et traités selon les techniques histologiques classiques<sup>1</sup>.

**Résultats.** Rappelons qu'après 2 mois de castration l'épididyme est très régressé. Les tubes épithéliaux de

faible diamètre (40 à 60  $\mu\text{m}$ ) sont entourés d'une épaisse gaine conjonctivo-musculaire et largement séparés les uns des autres par un abondant tissu conjonctif. La hauteur des cellules épithéliales ne dépasse pas 25  $\mu\text{m}$  (Figure 1).

**Cultures sans hormone.** Les explants cultivés sans hormone se maintiennent en bon état pendant les 15 premiers jours de culture. Leurs tubes épithéliaux restent de faible diamètre (60  $\mu\text{m}$ ) et les cellules épithéliales sont cubiques comme chez les témoins non cultivés. Au delà de 15 jours les explants commencent à se nécroser.

**Effet de la testostérone.** L'adjonction de cette hormone permet une plus longue survie des explants en culture (23 et 30 jours). À la dose de 25 ng/ml de milieu (100 nM/ml), l'action de la testostérone est importante et intéresse l'explant tout entier. Alors qu'en période d'activité sexuelle le diamètre des tubes épидидymaires est de 150 à 200  $\mu\text{m}$ , on observe chez les explants cultivés pendant 23 jours des tubes dont le diamètre varie de 100 à 170  $\mu\text{m}$ . Ces tubes sont entourés d'une très mince gaine conjonctivo-musculaire, le tissu conjonctif le séparant est extrêmement réduit. Les cellules épithéliales sont très élevées (jusqu'à 60  $\mu\text{m}$ ) et sécrètent abondamment (Figure 2). On note la présence de nombreux grains de sécrétion dans la lumière d'un certain nombre de tubes. À 30 jours, les cellules de certains tubes ne sécrètent plus alors qu'il y a des sécrétions résiduelles dans la lumière. Les tissus sont par ailleurs en bon état et de nombreuses figures de mitoses ont été observées.

**Effet de la 5  $\alpha$ -DHT.** Après 23 jours de culture en présence de ce métabolite, l'aspect de l'explant par rapport aux témoins est également très modifié. Le diamètre moyen des tubes est passé de 50  $\mu\text{m}$  chez le témoin à 120  $\mu\text{m}$  en présence de 5  $\alpha$ -DHT. La gaine conjonctivo-musculaire est mince mais le tissu conjonctif est plus abondant que chez les explants cultivés en présence de la même dose de testostérone. Les cellules épithéliales sont de taille variable, ne dépassant pas 35  $\mu\text{m}$  mais contiennent de nombreux et volumineux grains de sécrétion (Figure 3).

**Discussion.** Ces expériences montrent qu'il est possible d'effectuer des cultures de longue durée de l'épididyme de lézard, mais un apport hormonal est nécessaire pour maintenir les organes au delà de 15 jours. À 30 jours, les explants montrent encore des figures de mitoses dans le tissu épithélial.

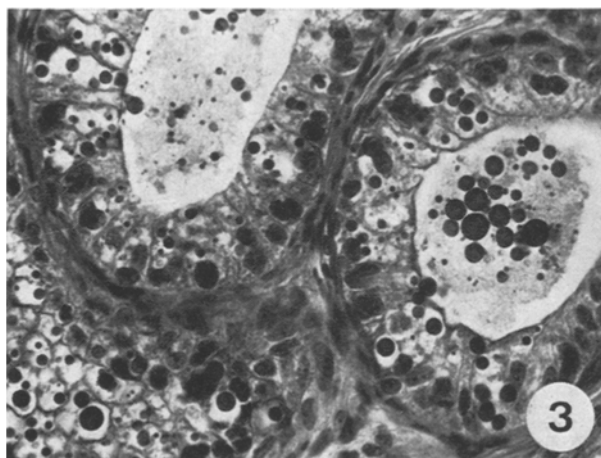


Fig. 3. Epididyme de lézard castré cultivé pendant 23 jours en présence de 100 nM de 5  $\alpha$ -DHT/ml de milieu.  $\times 400$ .

<sup>5</sup> TH. FEYEL-CABANES, P. PENNEQUIN, E. E. BAULIEU et P. ROBEL, C. r. Acad. Sci., Paris Ser. D 278, 2181 (1974).

Les hormones éprouvées sont efficaces à des doses très faibles (100 nM/ml d'un milieu avec sérum) comme pouvaient le laisser prévoir les résultats récents sur la prostate de rat<sup>6,7</sup>. Avec la testostérone, la réponse est beaucoup plus importante aux doses de 100 nM/ml qu'à fortes doses. Les images de l'épithélium sécréteur sont très voisines de celles observées chez les animaux en activité sexuelle. Nous ne pensons pas que l'augmentation des temps de culture suffise à expliquer l'amélioration importante des résultats enregistrés avec la testostérone bien que l'on sache par ailleurs que la reprise d'activité de cet organe au cours du cycle sexuel s'étale sur plusieurs mois. Il est vraisemblable que la testostérone manifestait un effet toxique à des doses élevées qui n'empêchait pas l'augmentation du volume cellulaire mais freinait la sécrétion. Sous réserve d'une étude quantitative ultérieure, cette réponse nous paraît même meilleure qu'avec les différents métabolites testés jusqu'à présent à fortes doses<sup>3</sup>. D'autre part, si une bonne stimulation a été observée avec la 5  $\alpha$ -DHT à la dose de 100 nM/ml, la réponse n'est pas meilleure qu'avec des doses de 20  $\mu$ M/ml.

Ces résultats apportent une lumière nouvelle au modèle du mécanisme d'action des androgènes dans l'épididyme

de lézard<sup>3</sup>. À moins de pouvoir montrer ultérieurement que la dose de 100 nM/ml de 5  $\alpha$ -DHT est elle-même trop élevée, le rôle joué par ce métabolite nous paraît devoir être réévalué.

*Summary.* In contrast to earlier results obtained with high doses of testosterone and 5  $\alpha$ -DHT given for short periods (10 days), very low doses of testosterone are more potent than 5  $\alpha$ -DHT in stimulating regressed epididymis cultivated for 23 days.

ANNIE GIGON

Laboratoire du Prof. J. P. Dufaure,  
Biologie cellulaire et génétique, Complexe Universitaire  
des Cèzeaux, Boîte postale 45,  
F-63170 Aubière (France), 15 avril 1975.

<sup>6</sup> P. ROBET et E. E. BAULIEU, C. r. Acad. Sci., Paris 274, 3295 (1972).

<sup>7</sup> P. ROBET, C. CORPECHOT, M. MARCHUT, C. MERCIER-BODARD, M. TH. PICARD, TH. FEYEL-CABANES et CL. LE GOASCOGNE, Colloque de Royaumont du 27 octobre 1973.

## Free Amino Acids in the Haemolymph of the Last Instar Nymph of the Dragonfly, *Orthetrum chrysis* (Selys) (Odonata: Libellulidae) I. Effects of Centrifugation and Starvation

While much work has been done in higher groups of insects, there is little information about the amino acids in the haemolymph of the dragonflies. The present investigation has been undertaken to determine the free amino acid composition of the last instar nymph of the dragonfly, *Orthetrum chrysis* (Selys). In this paper, the effects of centrifugation as a stress factor, and of starvation on amino acid composition of haemolymph are discussed.

The amino acids were analyzed by thin layer chromatography (TLC) as described elsewhere<sup>1</sup>. The procedure was repeated several times to confirm the results.

The analysis of the haemolymph of the last instar nymph of the dragonfly, *Orthetrum chrysis* reveals the presence of 15 amino acids (Table). They are: ornithine, histidine, lysine, aspartic acid, serine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, tryptophan, valine, isoleucine and phenylalanine. After 10 min of centrifugation, the haemolymph shows the presence of 20 amino acids. Besides 15 amino acids found in the haemolymph of normal nymphs, the 5 additional amino acids are glutamic acid,  $\alpha$ -amino-*n*-butyric acid, methionine, cystine and leucine.

After starvation for 4 days, there are only 17 amino acids. They are; ornithine, histidine, lysine, aspartic acid, serine, arginine, glycine, threonine, alanine, proline, tyrosine, tryptophan, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine and glutamic acid. The additional amino acids observed are glutamic acid and leucine. They were not observed in the haemolymph of the normal nymphs. Moreover, in the starved nymphs, these amino acids are more prominent.

The composition of free amino acids in haemolymph depends upon the nature of the food, physiological activities and ecological conditions<sup>2-8</sup>. In the haemolymph of the last instar nymph of the dragonfly, *Orthetrum chrysis*, under normal conditions, 15 amino acids are present. 5 of these, lysine, histidine, serine, tryptophan and proline, occur in greater concentration as compared

to other amino acids, and this state persists throughout the intermolt period of the last instar nymph. GILMOUR<sup>3</sup> also noted the presence in greater concentration of the same amino acids and believed that they play an active role in molting and metabolism. Most of the other free amino acids do not show significant changes in their concentration.

After centrifugation, 5 amino acids, glutamic acid, methionine,  $\alpha$ -amino-*n*-butyric acid, cystine and leucine, appear, in addition to 15 amino acids found in the haemolymph of the normal insects. The appearance of these additional 5 amino acids in the centrifuged insects and their non-detection under normal conditions suggest their active utilization in the metabolic process.

Cystine is detectable only in centrifuged samples, though in minute quantity, which confirms the observations of other workers<sup>9-12</sup>.

<sup>1</sup> V. K. THAKARE and D. B. TEMBHARE, Zool. Beitr., in press (1976).

<sup>2</sup> M. FLORKIN, in *Biochemistry of Insects* (Ed. L. LEVENBOOK, Pergamon Press, Oxford 1959).

<sup>3</sup> D. GILMOUR, *The Biochemistry of Insects* (Academic Press, New York 1961).

<sup>4</sup> D. GILMOUR, *The Metabolism of Insects* (Oliver and Boyd, London 1965).

<sup>5</sup> P. S. CHEN, in *Amino Acid Pool* (Ed. J. T. HOLDEN; Elsevier, Amsterdam 1962).

<sup>6</sup> P. S. CHEN, in *Advances in Insect Physiology* (Academic Press, New York 1966), vol. 3, p. 53.

<sup>7</sup> M. FLORKIN and C. JEUNIAUX, in *The Physiology of Insects* (Ed. M. ROCKSTEIN, Academic Press, New York 1965), vol. 3, p. 110.

<sup>8</sup> V. B. WIGGLESWORTH, *The Principles of Insect Physiology* (English language Book Society (ELBS) and Chapman and Hall Ltd., London 1972).

<sup>9</sup> P. S. CHEN, J. Insect Physiol. 9, 453 (1963).

<sup>10</sup> J. P. SINGH, Zool. Beitr. 18, 315 (1972).

<sup>11</sup> Z. S. ZAIDI and M. A. KHAN, Indian J. Ent. 34, 330 (1972).

<sup>12</sup> T. INOKUCHI and T. ITO, J. seric. Sci., Tokyo 42, 105 (1973).