

Activité biologique de la Gonadotropine urinaire de ménopause soumise à l'action de différents enzymes

Conditions d'expérience	Durées d'incubation			
	0 h	1 h	6 h	24 h
Témoin	21 ± 3			
Témoin pH 7,3				24 ± 4,5
Témoin pH 6,3				21,5 ± 3
Témoin pH 8				19,5 ± 1,5
Témoin pH 5,5				28 ± 8
Témoin pH 2			10,5 ± 2,5	
Pepsine			10,5 ± 3	
Trypsine	26 ± 7	22 ± 4,5	10 ± 1,5	
Chymotrypsine	23 ± 5	22 ± 4	8 ± 3,5	
Papaïne	19 ± 3	18 ± 2,5	12 ± 4,5	
Carboxypeptidase	9,5 ± 3,5			
Glucosidase	21 ± 4	24 ± 5	14 ± 4,5	
RDE	10 ± 1,5			

L'activité est exprimée en poids d'utérus de souris pour un poids de 0,01 mg d'hormone injectée. Le poids des utérus des animaux non injectés est de 5,5 mg ± 1,5.

Méthodes. Le substrat était une préparation hormonale 100 fois plus active que le standard HMG 24.

Le test biologique était celui de l'augmentation du poids d'utérus chez la souris impubère de 21 jours et de 10–12 g ; une seule injection était pratiquée, et les animaux étaient sacrifiés et disséqués 72 h après l'injection³. Cinq souris étaient utilisées pour chaque échantillon à doser.

Les enzymes protéolytiques et la glucosidase étaient des produits purs cristallisés (Worthington). La neuraminidase était une préparation de «Receptor.Destroying Enzyme» (Behringwerke). Chaque enzyme était utilisée à son pH optimum, en milieu tamponné: pH 7,3 pour trypsine, chymotrypsine et papaïne, pH 2 pour la pepsine, pH 8 pour la carboxypeptidase, pH 5,4 pour la glucosidase et pH 6,3 pour le RDE. Le rapport enzyme/substrat était 1/50. Les incubations étaient effectuées à 37° sous toluène. Pour chaque essai, une solution témoin d'hormone était préparée dans les mêmes conditions, mais sans enzymes.

Des quantités identiques (0,01 mg/par animal) d'hormone témoin et d'hormone ayant subi l'action des enzymes étaient injectées, au bout des temps d'incubation déterminée. Ainsi pouvaient être mis en évidence le maintien ou la perte d'activité, selon que les moyennes des poids d'utérus obtenus étaient égales ou présentaient une variation significative.

Résultats. Plusieurs séries d'expériences ont été effectuées pour chaque enzyme (350 souris ont été utilisées). Le tableau résume les résultats obtenus.

Le poids d'utérus des animaux non injectés est de 5,5 ± 1,5 mg. L'injection de 0,01 mg d'hormone non incubée donne un poids d'utérus de 21 ± 3 mg (moyenne de 50 animaux).

Remarquons tout d'abord qu'à pH 7,3, 8, 6,3 ou 5,4, l'incubation de l'hormone à 37°, durant 24 h (durée maximum des temps d'action des enzymes), n'a aucune action sur son activité, lorsque les enzymes sont absents. Au contraire, à pH 2, une chute importante est enregistrée au bout de 6 h; cette perte d'activité du témoin interdit toute étude de l'action de la pepsine.

La trypsine, la chymotrypsine, la papaïne semblent ne pas avoir d'action au bout de 6 h d'incubation, puisqu'aucune modification significative du poids d'utérus n'est enregistrée. D'ailleurs, les essais effectués pour des temps intermédiaires confirmaient ce résultat. L'incubation pro-

longée durant 24 h entraînait une perte sensible de l'activité; des essais supplémentaires ont permis, grâce à l'injection de concentrations plus élevées d'hormone incubée, de chiffrer cette perte à environ 50% en 24 h.

La carboxypeptidase a, au contraire, une action très rapide, puisqu'au bout d'une heure, on ne retrouve pratiquement plus d'augmentation du poids d'utérus, par rapport à l'animal non injecté.

La gonadotropine urinaire étant une glycoprotéine, comme toutes les gonadotropines, il était intéressant d'étudier également l'action de certains enzymes glucidolytiques. Ainsi, la glucosidase, sans action, comme les endopeptidases utilisées, durant 6 h, semble entraîner une légère perte d'activité au bout de 24 h.

Quant au RDE, son action, comme celle de la carboxypeptidase est très rapide, puisqu'au bout d'une heure, la perte d'activité est très nette. Ce résultat, lié à la libération des acides sialiques, est à rapprocher de celui obtenu par la seule incubation à pH 2: en effet, il est vraisemblable que la perte d'activité en milieu acide est due, au moins en partie, à la rupture de la liaison labile des acides sialiques avec la molécule.

En conclusion, les exopeptidases inactivent rapidement (1 h) cette hormone, tandis que les endopeptidases n'ont aucune action significative sur l'activité biologique pendant les six premières heures d'incubation. Ces résultats peuvent être opposés à ceux obtenus pour l'autre gonadotropine urinaire, l'hormone chorionique: en effet, cette gonadotropine perdait environ 60% de son activité après 6 h d'incubation par la trypsine, la chymotrypsine et la papaïne, alors qu'elle résistait 3 h à l'action de la carboxypeptidase⁴.

R. GOT et R. BOURRILLON

Laboratoire de Chimie Médicale, Faculté de Médecine, Paris, le 13 juillet 1960.

Summary

The action of various proteolytic and glucidolytic enzymes on the biological potency of Human Menopausal Gonadotropin was studied. Trypsin, chymotrypsin, papain and glucosidase attack the gonadotropin only after 6 h of digestion. Carboxypeptidase and RDE produce a rapid inactivation.

³ P. J. CLARINGBOLD et D. R. LAMOND, J. Endocrinol. 16, 86 (1957).

⁴ R. BOURRILLON, R. GOT et R. MARCY, Acta Endocrinol. 31, 553 (1959).

In vitro Study of Fe-Cystine Chelate Implicated in Fusaric Wilt of Cotton

Cystine is reported to withhold iron from toxic principle (s) of host-parasite interaction, thus preventing toxin potentiation¹. This mechanism of chelation, involving cystine, iron, and one of the phytotoxins (fusaric acid) implicated in cotton wilt has been investigated here *in vitro*.

I am most grateful to Professor T. S. SADASIVAN for guidance and encouragement and to Dr. S. SURYANARAYANAN for valuable suggestions. I thank the University Grants Commission for the award of a Fellowship.

¹ K. LAKSHMINARAYANAN, Exper. 11, 388 (1955). – D. SUPRAMANIAN, Doctoral Thesis, Univ. Madras (1956).

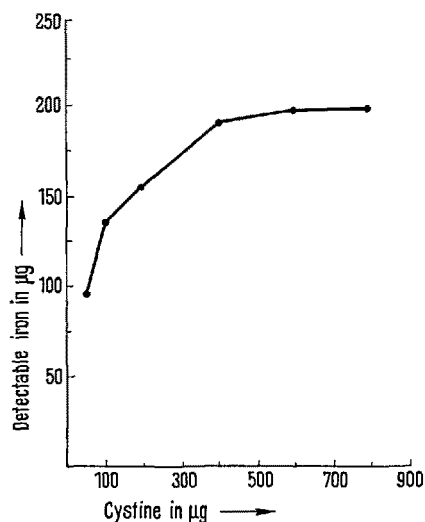


Fig. 1. Retention of iron in solution as effected by cystine.

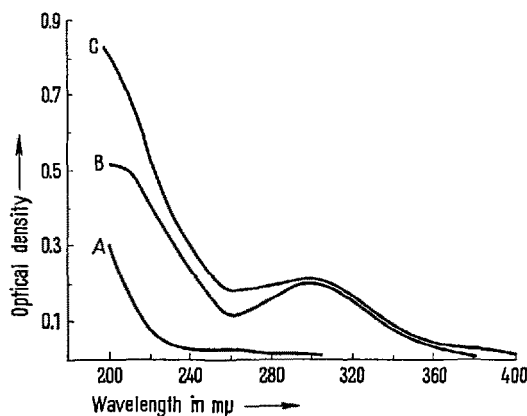


Fig. 2. Absorption spectra of A: cystine; B: iron; C: cystine-iron.

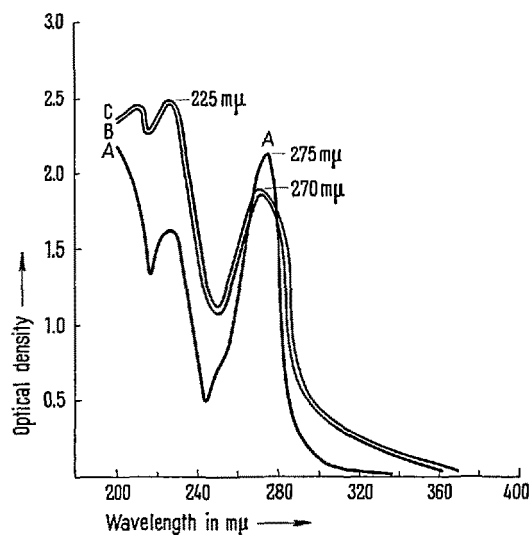


Fig. 3. Absorption spectra of A: fusaric acid; B: fusaric acid-iron; C: fusaric acid-cystine-iron.

 R_f Values of Cystine, Iron, and Cystine-Iron

	Spray reagent used	No. of spots	Colour of spots	R_f	Area of spots in mm ²
Iron	Potassium ferrocyanide	1	Blue	0.380	164
Cystine	Ninhydrin	1	Purple	0.210	194
Cystine-iron	Potassium ferrocyanide	1	Blue	0.389	169
Cystine-iron	Ninhydrin	1	Purple	0.210	196

Colorimetry: If cystine and iron chelate, it ought to affect precipitation of iron hydroxide from an aqueous solution of ferric iron, as metals bound in chelate rings lose their ionic characteristics and are less subject to participation in chemical reactions. Therefore, increasing concentrations of cystine (50–900 µg) were added to 200 µg aliquots of iron in aqueous ferric ammonium sulphate (pH 4–5), volume made up to 10 ml, left overnight, centrifuged, and supernatant analysed for iron spectrophotometrically in terms of intensity of colour with thioglycolic acid and α, α' -dipyridyl. Figure 1 indicates that the amount of iron detected in solution is directly proportional to the amount of cystine added.

Chromatography: Ascending chromatograms were run, using cystine, iron, and cystine-iron combinations (with *N*-butanol: HCl: water in the ratio 4:1:2, as solvent). The quantity of cystine and iron spotted being constant, the R_f and area of spots developed by cystine and iron individually, correspond to those given by cystine-iron combinations (Table).

Spectrophotometry as a technique for estimating chelates has been reported by HILL-COTTINGHAM². Absorption spectra of cystine, iron, and fusaric acid, and combinations of the three were studied. Results show that the spectral pattern of cystine-iron combination is merely an additive one of the individual spectra of the two substances (Figure 2). The spectrum of fusaric acid, however, is altered by the addition of iron, and this iron-fusaric acid spectrum remains uninfluenced by cystine (Figure 3).

Discussion: The foregoing observations seem to rule out the possibility of a chelation between cystine and iron *in vitro*. If chelation is involved, the consequent change in molecular configuration should result in an altered spectral pattern and, indeed, spectral patterns (Figures 2 and 3) show no such alteration indicative of chelation. Chromatographic findings also seem to confirm the spectrophotometric results. However, the retention of iron in solution in the presence of cystine (Figure 1) may be due to the surface activity of cystine, as similar instances are now well known³. If a labile hydrated complex is formed between cystine and iron, it evidently does not affect the availability of iron for other reactions.

The repercussions of the above findings in the context of *Fusarium* wilt of cotton seem far reaching. The applicability, however, of these *in vitro* findings to *in vivo* studies remains to be investigated.

S. MALINI

University Botany Laboratory, Madras (India), June 27, 1960.

² D. G. HILL-COTTINGHAM, *Nature* 175, 347 (1955); *Analyst* 80, 906 (1955).

³ M. MILONE and G. CETINI, *Ann. Chim.*, Rome 41, 326 (1951). – W. A. DELONG and M. SCHNITZER, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 19, 360 (1955).

Zusammenfassung

Die Möglichkeit einer Chelatbildung zwischen Cystin, Fusarinsäure und Eisen *in vitro* wurde untersucht. Während Fusarinsäure und Eisen einen stabilen Komplex bilden, ergaben kolorimetrische, chromatographische und spektrophotometrische Untersuchungen wenig Anhaltspunkte für eine Chelierung von Cystin und Eisen.

Der Einfluss von Acetylcholin auf die ^{42}K -Abgabe postnataler, denervierter und reinnervierter Skelettmuskulatur

Sowohl das denervierte wie auch das embryonale bzw. postnatale Rattenzwerchfell sind überempfindlich gegenüber Acetylcholin (ACh). Dies lässt sich durch die Ausbildung einer ACh-Kontraktur (am denervierten Muskel MÜSCHOLL und LÜLLMANN¹, am embryonalen Muskel RÜCKERT²) und durch Messung des Membranpotentials (LÜLLMANN und PRACHT³, AXELSSON und THESLEFF⁴, DIAMOND und MILEDI⁵) demonstrieren. Die Depolarisation des denervierten Skelettmuskels durch ACh wird durch eine Zunahme der Ionenpermeabilität verursacht, die unter anderem auch für Kaliumionen gilt (KLAUS, KUSCHINSKY, LÜLLMANN und MUSCHOLL⁶). Wir prüften jetzt, ob die Steigerung der ^{42}K -Abgabe durch ACh auch

am postnatalen Skelettmuskel des Warmblüters auftritt und ob der reinnervierte Muskel sich wieder wie ein normalinnervierter Muskel verhält. Mit der an anderer Stelle ausführlich dargestellten Methode (KLAUS, LÜLLMANN und MUSCHOLL⁷) wurde die Aktivität des mit ^{42}K aufgeladenen Muskels und die von dem Muskel abgegebene ^{42}K -Menge fortlaufend registriert. Wir benutzten für unsere Versuche Zwerchfelle von Ratten am 3.–4. Tage *post natum*, Kontrollmuskeln von 100–120 g schweren Ratten, Zwerchfelle 8–12 Tage nach Exhärese des N. phrenicus und Muskeln, die nach etwa 20 Wochen reinnerviert waren.

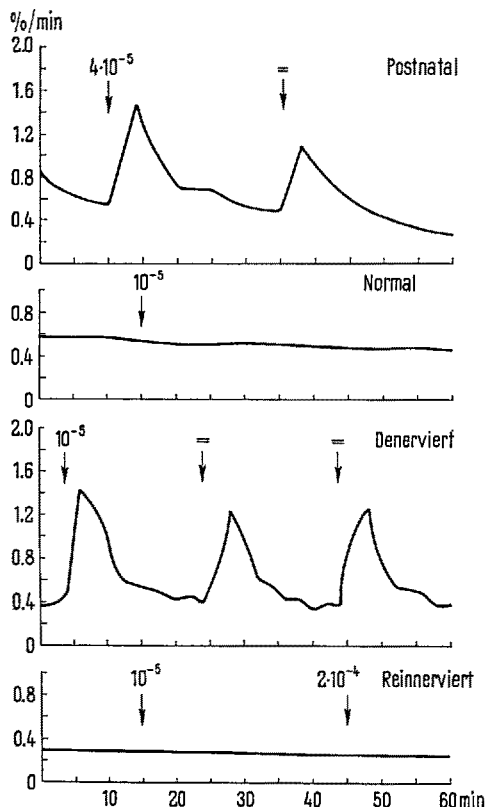
Die Versuchsergebnisse sind jeweils durch ein Beispiel in der Abbildung dargestellt. Das postnatale Zwerchfell reagiert auf Zusatz von ACh mit einer Zunahme der ^{42}K -Abgabe. Der normale Muskel und das reinnervierte Zwerchfell sind unempfindlich gegenüber ACh, während der denervierte Skelettmuskel mit einer starken Zunahme der ^{42}K -Abgabe reagiert. Die ACh-Reaktion des Zwerchfells 3 und 4 Tage nach der Geburt ist schwächer als die eines 7–14 Tage lang denervierten Muskels unter gleichen Versuchsbedingungen. Wie DIAMOND und MILEDI⁵ zeigen konnten, sind zu diesem Zeitpunkt die endplattenfernen Muskelabschnitte bereits unempfindlich gegenüber ACh geworden. Somit wird nur ein Teil der Muskelzelloberfläche zur ACh-Reaktion beigetragen haben. Das reinnervierte Rattenzwerchfell verhält sich mit Ausnahme des histologischen Querschnittbildes wie ein normaler Muskel (KUSCHINSKY, LÜLLMANN, HOFKE und MUSCHOLL⁸; LÜLLMANN und PRACHT³). Es ist daher auch nicht erstaunlich, dass der reinnervierte Skelettmuskel keine Überempfindlichkeit gegenüber ACh besitzt. Die postnatale Ausreifung des Nervus phrenicus (PETERS und MUIR⁹) und der Reinnervationsprozess führen also zu demselben Ergebnis: Einengung des ACh-empfindlichen Areals auf die Endplattenregion.

W. KLAUS, H. LÜLLMANN
und E. MUSCHOLL

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz,
1. August 1960.

Summary

The loss of ^{42}K from the isolated rat diaphragm into the bathing solution is increased by acetylcholine, (a) 3 to 4 days after birth, (b) 7 to 14 days after sectioning of the phrenic nerve. The ^{42}K loss is not altered by acetylcholine in the diaphragm of adult rats and after the denervated diaphragm has become reinnervated.



Die ^{42}K -Abgabe (%/min) am postnatalen (4 Tage nach der Geburt), normalen, denervierten (9 Tage nach Denervation) und reinnervierten (21 Wochen nach Denervation) Rattenzwerchfell unter der Einwirkung von Acetylcholin. Die AcetylcholinKonzentrationen sind in g/ml angegeben.

- ¹ E. MUSCHOLL und H. LÜLLMANN, Arch. exp. Path. Pharmacol. 226, 88 (1955).
- ² W. RÜCKERT, Arch. exp. Path. Pharmacol. 150, 221 (1930).
- ³ H. LÜLLMANN, und W. PRACHT, Exper. 13, 288 (1957).
- ⁴ J. AXELSSON und S. THESLEFF, J. Physiol. 147, 178 (1959).
- ⁵ J. DIAMOND und R. MILEDI, J. Physiol. 149, 50 P. (1959).
- ⁶ W. KLAUS, G. KUSCHINSKY, H. LÜLLMANN und E. MUSCHOLL, Med. exp. 1, 8 (1959).
- ⁷ W. KLAUS, H. LÜLLMANN und E. MUSCHOLL, Pflüg. Arch. ges. Physiol. 271, 761 (1960).
- ⁸ G. KUSCHINSKY, H. LÜLLMANN, W. HOFKE und E. MUSCHOLL, Anat. Anz. 103, 116 (1956).
- ⁹ S. A. PETERS und A. R. MUIR, Quart. J. exp. Physiol. 44, 117 (1959).