

widening of the interval was accompanied by a high degree of individual dispersity. For that reason we have decided to withhold the publication of our data until more information is obtained on a larger number of animals.

The effect of irradiation in infancy on the occurrence of opening of the vagina in rats with and without hypothalamic lesions

	No. of rats	Age (days)	Body weight (g)
Without hypothalamic lesions			
Normal	83	44.0 ± 4.75	108 ± 14.1
Irradiated with 200 R	13	43.2 ± 3.17	109 ± 10.3
Irradiated with 400 R	48	46.5 ± 3.96	89 ± 16.2
Irradiated with 500 R	8	50.6 ± 6.42	83 ± 6.9
With hypothalamic lesions			
Non-irradiated	32	31.8 ± 4.09	55 ± 18.7 <sup>a</sup>
Irradiated with 200 R	9	35.4 ± 0.83	84 ± 11.5
Irradiated with 400 R	25	37.5 ± 4.00	72 ± 11.8

<sup>a</sup> The mean and the standard deviation estimated for 27 animals.

The results presented suggest that lesions in the hypothalamus effected through microcoagulation accelerate the onset of puberty in the total body X-irradiated rats analogous to what they do in normal animals, but that the exposure to X-rays delays the puberty proportionally to the dose whether a microcoagulation has been performed or not. Further work on the effects of irradiation of the head only of animals with and without hypothalamic lesions is in progress.

**Résumé.** Les résultats obtenus suggèrent que la lésion de l'hypothalamus provoquée par la microcoagulation accélère l'apparition de la puberté des rats totalement irradiés aux rayons X, ce qui est le cas aussi chez des rats normaux. Mais l'apparition de la puberté est retardée proportionnellement aux doses de rayons X appliquées, indépendamment de la microcoagulation.

P. N. MARTINOVITCH, O. K. IVANIŠEVIĆ  
and J. V. MARTINOVIC

*Institute of Nuclear Sciences 'Boris Kidrich'  
Beograd (Yugoslavia),  
6 February 1968.*

## La voie du pentose phosphate dans le métabolisme du glucose et son interaction avec la glutathion-réductase dans les noyaux de foie de rat

La présence des enzymes du cycle de l'hexose monophosphate dans les noyaux cellulaires est très controversée<sup>1-5</sup>. Cette incertitude tient à plusieurs causes d'erreur provenant de la méthode d'isolement des noyaux (perte en protéines, contamination par des cellules entières ou par des débris cytoplasmiques). Récemment, nous avons réussi à isoler des noyaux de foie de rat dans un milieu de saccharose tamponné, en utilisant des tensio-actifs pour faire éclater les cellules. Le fait que par cette méthode, les causes d'erreur citées ci-dessus sont éliminées, nous a incité à étudier le métabolisme du glucose par la voie du pentose phosphate en le comparant à celui de la fraction cytoplasmique soluble. Les résultats présentés ici concernent l'activité de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G-6-PD) (EC 1.1.1.49) et de la 6-phosphogluconate-déshydrogénase (6-PGD) (EC 1.1.1.44) des noyaux de foie de rat, ainsi que l'interaction de ces enzymes avec la glutathion-réductase (GSSG-réductase) (EC 1.6.4.2), interaction qui pourrait être un mécanisme de réoxydation du NADPH dans les noyaux cellulaires.

La méthode de préparation des noyaux sera décrite dans une publication ultérieure<sup>6</sup>. Les extraits solubles et les homogénats de noyaux, préparés dans le *Tris* 0,05 M,  $MgCl_2$  0,5 mM (pH 7,4), n'ont montré que des traces d'activité de G-6-PD, par la mesure directe au spectrophotomètre (méthode décrite par GLOCK et MCLEAN<sup>7</sup>), sans doute à cause de l'interférence de la GSSG-réductase<sup>8</sup>. Nous avons donc mesuré les activités de G-6-PD et de 6-PGD ensemble, par la formation de  $^{14}CO_2$  à partir du glucose-1- $^{14}C$  ou du glucose-1- $^{14}C$  6-phosphate. Les conditions expérimentales sont décrites dans les légendes des Tableaux. Les protéines sont dosées selon la méthode décrite par FISZER<sup>9</sup>.

Les résultats du Tableau I montrent que les noyaux de foie de rat transforment le glucose-1- $^{14}C$  en  $^{14}CO_2$ , par la voie oxydative de l'acide 6-phosphogluconique. Cependant, l'activité est plus forte avec le glucose-1- $^{14}C$  6-phosphate (exp. 2). Les extraits solubles de ces noyaux ne contiennent que des traces d'hexokinase, bien que les autres enzymes glycolytiques s'y trouvent en quantités appréciables<sup>6</sup>. Il n'est donc pas surprenant que l'activité nucléaire, en présence d'ATP et de glucose-1- $^{14}C$ , soit faible. Le Tableau I montre également que le surnageant cytoplasmique transforme facilement le glucose-1- $^{14}C$  en  $^{14}CO_2$ , et que l'activité est beaucoup plus forte avec le glucose-1- $^{14}C$  6-phosphate. Avec le glucose-1- $^{14}C$  comme substrat, l'addition de noyaux à la fraction cytoplasmique provoque, dans les conditions de l'expérience, une inhibition de 75% du  $^{14}CO_2$  formé. Une telle inhibition n'est pas observée avec le glucose-1- $^{14}C$  6-phosphate. En supprimant l'ATP et en augmentant la concentration du glucose-1- $^{14}C$  6-phosphate on obtient, d'une part, une augmenta-

- H. STERN et A. E. MIRSKY, *J. gen. Physiol.* 37, 177 (1953).
- B. S. McEWEN, V. G. ALLFREY et A. E. MIRSKY, *J. biol. Chem.* 238, 2579 (1963).
- G. SIEBERT, *Biochem. Z.* 334, 369 (1961).
- C. DE DUVE, R. WATTIAUX et P. BAUDHUIN, *Adv. Enzymol.* 24, 291 (1962).
- C. C. WIDNELL et J. R. TATA, *Biochem. J.* 92, 313 (1964).
- C. E. SRIPATI et Y. KHOUVINE, en préparation.
- G. E. GLOCK et P. MCLEAN, *Biochem. J.* 55, 400 (1953).
- H. DEAKIN, M. G. ORD et L. A. STOCKEN, *Biochem. J.* 89, 296 (1963).
- B. FISZER, *Bull. Soc. Chim. biol.* 46, 403 (1964).

Tableau I. Transformation du glucose-1-<sup>14</sup>C et du glucose-1-<sup>14</sup>C 6-phosphate en <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> par les noyaux et la fraction cytoplasmique du foie de rat et effet de l'addition des noyaux à la fraction cytoplasmique

	Glucose-1- <sup>14</sup> C			Glucose-1- <sup>14</sup> C 6-phosphate			Exp. 3	
	Exp. 1		Exp. 2					
	dpm totales	Inhibition %	dpm/mg protéines	dpm totales	Inhibition %	dpm/mg protéines	dpm totales	dpm/mg protéines
Noyaux	36	—	17	170	—	74	288	100
Fraction cytoplasmique	3592	—	345	27372	—	2483	10529	1020
Noyaux + fraction cytoplasmique	968	73	—	25488	8	—	10810	—

La formation du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a été déterminée dans des fioles de WARBURG<sup>2</sup>. Les incubations sont faites pendant 40 min en présence d'azote, dans 2,7 ml du milieu contenant: Tris, 18,5 mM (pH 7,6); MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; ATP, 1 mM (sauf dans l'expérience 3); NADP, 0,3 mM; glucose-1-<sup>14</sup>C, 0,4  $\mu$ C/2 mmoles, dans l'expérience 1; glucose-1-<sup>14</sup>C 6-phosphate, 0,4  $\mu$ C/2 mmoles; et 0,8  $\mu$ C/4 mmoles respectivement dans les expériences 2 et 3; et soit 0,5 ml de noyaux (environ 2,5 mg de protéines) dans le saccharose 0,25 M, soit 0,5 ml de fraction cytoplasmique préparée selon la méthode de PALADE et SIEKEVITZ<sup>13</sup> (10 mg de protéines environ) ou les 2 ensembles. On ajoute 0,1 ml d'acide perchlorique pour arrêter la réaction et libérer le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> du milieu.

Tableau II. L'action de NAD et GSSG sur l'activité de la glucose 6-phosphate et 6-phosphogluconate-déshydrogénase des noyaux de foie de rat

Additions	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> dpm/mg protéines
Millieu (sans NADP)	5
+ NADP	63
+ NAD	6
+ GSSG	5
+ NADP et NAD	109
+ NADP et GSSG	300

Les conditions sont les mêmes que pour l'expérience 2 du Tableau I, mais le milieu contient, par surcroît, de la nicotinamide, 40 mM; et NAD, NADP et GSSG sont en concentrations finales de 0,03, 0,03 et 0,15 mM respectivement. Durée d'incubation: 60 min.

tion de la formation de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> par la fraction nucléaire et, d'autre part, une diminution de l'activité de la fraction cytoplasmique. En présence des noyaux et du cytoplasme les quantités de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> sont additives (exp. 3). Ces résultats sont à rapprocher de ceux que nous avons déjà observés avec la glycolyse<sup>10</sup>. La glycolyse cytoplasmique, avec du glucose, est fortement inhibée par les noyaux. Cette inhibition provient d'une interférence avec la phosphorylation du glucose.

Les expériences du Tableau II montrent l'interaction entre la GSSG-réductase et les G-6-PD et 6-PGD nucléaires. Il n'y a pas formation de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> à partir du glucose-1-<sup>14</sup>C 6-phosphate, sans addition de NADP. En revanche, des activités non négligeables sont observées, même lorsque NADP est en concentration 10 fois plus faible que celle des expériences du Tableau I. Ni NAD ni GSSG ne peuvent remplacer NADP. Mais, si on ajoute l'un ou l'autre en présence d'une faible concentration de NADP, la formation de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> est toujours plus forte qu'avec NADP seul. Toutefois, l'effet de GSSG est, de beaucoup, le plus important, puisque la quantité de CO<sub>2</sub> formé est 5 fois plus élevée. De tels effets ne sont pas observés avec la cystine ou le GSH. Il se peut que l'activité de la dés-

hydrogénase s'arrête lorsque NADP est entièrement réduit et que s'accumule NADPH. L'augmentation de la formation de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, quand NAD ou GSSG sont également présents, est probablement due à la réoxydation de NADPH. L'activité la plus forte, observée en présence de GSSG, peut être due au fait que celui-ci se trouve être, dans les conditions de nos expériences, le meilleur accepteur d'hydrogène dans la réaction où intervient la GSSG-réductase. On a d'ailleurs décelé des quantités assez fortes de cet enzyme dans les noyaux de foie<sup>8,11,12</sup>.

Il n'y a pas jusqu'à présent de preuve certaine de l'existence, dans le noyau, de mécanismes bien définis de transfert d'électrons et d'hydrogène, bien qu'il y ait des systèmes classiques qui utilisent le glucose avec oxydoréduction concomitante où interviennent NAD et NADP. Etant donné que dans les noyaux de foie, le glutathion et la GSSG-réductase existent en proportions relativement grandes, il est possible que l'interaction observée entre la GSSG-réductase et G-6-PD et 6-PGD soit un des mécanismes normaux par lequel NADPH est réoxydé dans le noyau hépatique.

**Summary.** Rat liver nuclei, isolated in sucrose medium, convert carbon-1 of glucose-6-phosphate to CO<sub>2</sub> via the 6-phosphogluconic acid oxidative pathway. Conversion of glucose-1-<sup>14</sup>C to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> by the cytoplasmic fraction is greatly inhibited by nuclei. In the presence of low concentrations of NADP, the CO<sub>2</sub> formed by nuclei is markedly increased by the addition of GSSG.

C. E. SRIPATI et Y. KHOUVINE

*Institut de Biologie Physico-Chimique,  
Paris 5e (France),  
2 janvier 1968.*

<sup>10</sup> C. E. SRIPATI et D. SZAFARZ, Bull. Soc. Chim. biol. 46, 215 (1964).  
<sup>11</sup> H. STERN et S. TIMONEN, J. gen. Physiol. 38, 41 (1954).  
<sup>12</sup> T. Y. WANG, Nature 195, 1099 (1962).  
<sup>13</sup> G. E. PALADE et P. SIEKEVITZ, J. biophys. biochem. Cytol. 2, 171 (1956).