

Zusammenfassung. Der Gehalt an freien Aminosäuren von auf Rizinus-, Zizyphus- und Holzapfelblättern ernährten Larven und deren Puppen von *Euproctis fraterna* wurde vergleichend untersucht. Zwischen den beiden Stadien werden massgebende Unterschiede festgestellt. Während die Gesamtmenge der Aminosäuren im Larven- und Puppenstadium der mit Rizinus ernährten Insekten ähnlich war, wurden in den Puppen anders ernährter Tiere

bedeutend mehr Aminosäuren beobachtet als in Larven. γ -Aminobuttersäure kam nur im Larvenstadium vor.

R. N. PAL, R. C. BATRA, S. K. MUNSHI,
N. K. MEHROTRA and RAGHBIR SINGH

Regional Fruit Research Station, Punjab Agricultural
University, Abohar (Punjab, India), 4 April 1972.

Étude de l'activité in vitro de la glycogène phosphorylase de la Carpe (*Cyprinus carpio* L.)

La dégradation enzymatique du glycogène a fait l'objet de très nombreux travaux mettant en évidence le processus d'activation de la phosphorylase hépatique ou musculaire et l'existence de deux formes a et b de cette enzyme, respectivement active et inactive mais activable par le 5'AMP¹⁻³.

Relativement peu d'études ont été faites sur ce sujet en dehors des Mammifères; citons toutefois des recherches récentes chez *Tetrahymena pyriformis*⁴ et sur la phosphorylase musculaire de la Rousette⁵ et du Brochet⁶.

Dans le cadre d'une étude du métabolisme glucidique chez la Carpe, nous avons observé des modifications importantes des taux de glycogène tissulaire en fonction de facteurs saisonniers, nutritionnels ou endocriniens^{7,8}. Nous nous sommes alors proposés d'évaluer l'activité des enzymes intervenant dans la mobilisation du glycogène hépatique, cardiaque et musculaire.

Matériel et méthodes. Nos essais ont porté sur un total de 52 Carpes, variété commune ou miroir, de 300 à 600 g et gardées dans des bassins à eau renouvelée au laboratoire. Nous avons également utilisé, à titre comparatif, 4 Rats albinos et 5 Tanches communes.

Le dosage de la glycogène phosphorylase (E.C.2.4.1.1.) se fait classiquement en mesurant in vitro la libération de phosphate inorganique en présence d'un excès de glucose-1-phosphate selon la réaction $G-1-P \rightleftharpoons \text{glycogène} + P_i$ ⁹.

Nous avons utilisé un tampon maléate¹⁰ qui nous a donné des résultats très reproductibles chez le Rat et la Carpe (acide maléique, 1,16 g; NaF, 86 mg; mercapto-2-éthanol, 320 mg; sérum-albumine, 100 mg; eau distillée QS 100 ml; amené à pH 6.5 par NaOH 10N).

Le milieu d'incubation est constitué de: tampon maléate, 500 μ l; glucose-1-phosphate (30 mg/ml), 200 μ l; eau

distillée ou 5'AMP (2 mg/ml), 200 μ l; broyat de tissu, 200 μ l; le glycogène présent dans le tissu servant de 'primer'.

200 à 500 mg de tissu (foie, myocarde, muscle) sont prélevés très rapidement dans 5 ml de tampon maléate glacé et broyés à 'l'ultra-Turrax'. 1 ml d'acide trichloracétique à 15% glacé est ajouté au temps 0 (blanc) et au bout de 15 min. Après centrifugation, le phosphore inorganique est dosé par la méthode de FISKE et SUBBAROW. Les résultats sont exprimés en μ moles d'élément phosphore libéré en 15 min/g de tissu.

Résultats et discussion. 1. Cas de la glycogène phosphorylase musculaire. Le Tableau I montre que l'activité enzymatique chez la Carpe est beaucoup plus importante dans le myocarde et le muscle rouge que dans le muscle blanc qui est généralement considéré comme peu actif du point de vue métabolique. Les activités sont assez proches quoique plus faibles de celles observées dans le myocarde de Rat dans les mêmes conditions expérimentales. On remarque également qu'en présence de 5'AMP la quantité de phosphore libéré est très augmentée: la valeur obtenue correspond alors à la phosphorylase totale (forme a et forme b) contenue dans le tissu.

Nous avons essayé de déterminer l'optimum thermique de la réaction en incubant dans une série d'expériences un même broyat de tissu aux températures de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C.

Le Tableau II montre que nous obtenons significativement le maximum d'activité pour les tissus de poissons à 25°C au lieu de 30°C pour les Mammifères¹.

2. Cas de la glycogène phosphorylase hépatique. Sur les 52 Carpes utilisées, il n'a pas été possible d'obtenir une libération de phosphore inorganique au cours de l'incubation de broyat hépatique de Carpe. Au contraire, dans tous les essais, la quantité de phosphore libre existant dans le tissu au départ de la réaction (temps 0) était diminuée sensiblement, quoique de façon variable après 15 min d'incubation. Nous avons observé que pour une

Tableau I. Activité de la glycogène phosphorylase (μ M P_i libéré/15 mn/g de tissu, à 25°C)

Tissus	Nombre d'animaux	Sans 5' AMP	Avec 5' AMP
Myocarde de Carpe	10	61,7 \pm 7,9	101,5 \pm 12,5
Muscle rouge de Carpe	10	68,6 \pm 11,3	104,4 \pm 16,1
Muscle blanc de Carpe	8	13,9 \pm 7,4	22,6 \pm 11,4
Foie de Carpe	52	Essais négatifs	
Myocarde de Tanche	5	82,1 \pm 12,3	117,3 \pm 20,4
Foie de Tanche	5	118,1 \pm 24,5	169,2 \pm 27,9
Myocarde de Rat	4	103,0 \pm 20,8	135,7 \pm 23,9
Foie de Rat	4	180,3 \pm 29,6	216,2 \pm 31,8

(valeur moyenne pour des animaux pris dans les mêmes conditions \pm Sm. t 5%)

¹ T. W. RALL, W. D. WOSILAIT, E. W. SUTHERLAND, Biochim. biophys. Acta, 20, 69 (1956).

² V. T. MADDAIAH and N. B. MADSEN, Bioch. biophys. Acta 121, 261 (1966).

³ H. G. HERS, H. DE WULF and W. STALMANS, FEBS Lett. 12, 73 (1970).

⁴ V. KAHN and J. J. BLUM, Arch. Biochem. Biophys. 145, 382 (1971).

⁵ P. COHEN, T. DUEWER and E. H. FISCHER, Biochemistry 10, 2683 (1971).

⁶ S. V. MANOHAR and H. BOESE, J. Fish. Res. Bd. Canada 28, 1325 (1971).

⁷ J. C. MURAT and A. SERFATY, J. Physiol. Paris 63, 80 (1971).

⁸ G. BOUCHE, J. C. MURAT and J. P. PARENT, C. R. Soc. Biol. 165, 2202 (1971).

⁹ G. T. CORI and C. F. CORI, J. biol. Chem. 135, 733 (1940).

¹⁰ J. L. HEDRICK and E. H. FISCHER, Biochemistry 4, 1337 (1965).

Tableau II. Activité de la glycogène phosphorylase en fonction de la température d'incubation (exprimée en pourcentage de l'activité observée à 25°C)

Tissu	Nombre d'essais	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
Myocarde de Carpe	5	76,4 ± 6,6	84,6 ± 6,0	100	91,3 ± 4,1	78,2 ± 6,0	52,4 ± 7,2
Muscle rouge de Carpe	5	79,0 ± 7,8	88,7 ± 6,2	100	94,2 ± 3,2	73,1 ± 5,9	47,3 ± 8,8
Foie de Tanche	4	73,2 ± 8,0	86,9 ± 7,1	100	87,5 ± 6,1	71,6 ± 8,6	50,2 ± 10,1

Pourcentage moyen ± Sm. \pm 5%. Valeur arbitraire 100 à 25°C.

même expérience, cette diminution était proportionnelle à la durée de l'incubation.

Le foie de Rat ou le foie de Tanche, poisson proche de la Carpe, incubés dans les mêmes conditions expérimentales, ont montré des activités normalement mesurables. Ce résultat très étonnant nous a amené à envisager plusieurs hypothèses que nous nous efforçons actuellement de vérifier.

Nous avons pensé qu'il était possible que dans le foie de Carpe, par suite d'une particularité structurale de l'enzyme, la réaction ne se fasse in vitro que dans le sens physiologique, la surcharge en glucose-1-phosphate étant soit insuffisante, soit inhibitrice pour l'enzyme.

Nous avons vérifié que des concentrations 10 fois supérieures en glucose-1-phosphate dans le milieu de réaction ne modifiait pas l'anomalie.

D'autre part, le foie de Carpe est en fait un hétopancréas (comme le foie de Tanche d'ailleurs). Aussi avons nous ajouté dans une série d'expériences un inhibiteur de protéase (extrait de l'œuf) pour prévenir une éventuelle dénaturation de l'enzyme par la trypsine pancréatique. Cela n'a donné aucun résultat.

Il se peut également que le phosphore libéré à partir du glucose-1-phosphate soit utilisé très rapidement par une autre réaction, malgré la présence de NaF et les conditions expérimentales très strictes utilisées classiquement pour ce

dosage. Il resterait dans ce cas à expliquer pourquoi cette réaction parasite n'apparaît pas pour les autres tissus et en particulier le foie de Rat ou de Tanche.

On est peut être en droit de se demander si, dans tous les cas, la quantité de phosphore libéré, n'est pas la résultante de deux réactions enzymatiques, l'une libérant le phosphore, et en général dominante, et l'autre utilisant ce phosphore. Dans le foie de Carpe la deuxième réaction serait plus rapide que la première. Il conviendrait alors d'interpréter avec prudence les mesures d'activité de la phosphorylase.

Summary. In this paper we give some values of glycogen phosphorylase activity of heart, red muscle and white muscle from the Carp. We show that in vitro optimum temperature is 25°C for the fish, and not 30°C as in Mammals. We also made measurements with rat and tench liver, but it has been impossible, under the same experimental conditions, to observe normal release of inorganic phosphorus from G-1-P with carp liver.

J. C. MURAT, J. P. PARENT et A. SERFATY

Université Paul Sabatier, Laboratoire d'Ecophysiologie animale, 38, rue des 36 ponts, F-31 Toulouse 04 (France), 25 Février 1972.

Distribution of 5S RNA in the Liver of the South American Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*

Since its discovery in *Escherichia coli*¹, 5S RNA has been described in several classes of animals². In all systems studied it was found attached to the large ribosomal subunit. However, there is no information about this type of ribosomal RNA in Reptilia. In the present study it was found that 5S RNA of the liver of the South American rattlesnake is also attached to the large ribosomal subunit. The electrophoretic analysis on polyacrylamide gel showed that 5S RNA of this snake has the same electrophoretic mobility as that extracted from honey bee (*Apis mellifera* L.) and *Escherichia coli*.

Material and methods. Snakes weighing 200–300 g were killed by decapitation and the livers were quickly removed and washed in cold physiological saline. The livers were homogenized in a Potter-Elvehjem, teflon pestle, motor-driven homogenizer. The ribosomes were prepared from the tissue homogenate as described by MOLDAVE and SKOGERSON³. The concentration of ribosomes was estimated on the basis of UV-absorption (1 unit of A_{260 nm} = 90 µg of ribosomes). Ribosomes were dissociated into subunits by EDTA treatment and by dialysis according to MARTIN et al.⁴. The subunits were

separated by sucrose density gradient centrifugation. Gradient centrifugations were performed with 28 ml of a 10–30% (w/v) linear sucrose gradient containing 0.05M KCl — 0.01M Tris, pH 7.3. The tubes were centrifuged at 17,500 rpm for 14 h at 4°C in the SW 25.1 rotor with Spinco model L ultracentrifuge. After centrifugation, the bottom of the tubes was punctured with a hypodermic needle and the absorbance at 254 nm was continuously recorded with Instrumentation Specialties Co. (ISCO), model UA-2 UV-analyser. In some experiments the fractions of the gradient were directly collected in 1 ml of distilled water and the absorbance at 260 nm

¹ R. ROSSET and R. MONIER, Biochim. biophys. Acta 68, 653 (1963).

² M. AUBERT, R. MONIER, M. REYNIER and J. F. SCOTT, Proc. 4th. FEBS Meeting, Oslo 1967 (Eds. L. O. FRÖHOLM and S. G. LALAND; Academic Press, New York 1968), p. 151.

³ K. MOLDAVE and L. SKOGERSON, in *Methods in Enzymology* (Eds. L. GROSSMAN and K. MOLDAVE; Academic Press, New York 1967), vol. 12, part A, p. 478.

⁴ T. E. MARTIN, F. S. ROLLESTON, R. B. LOW and I. G. WOOL, J. molec. Biol. 43, 135 (1969).