

It is generally admitted that the discharge of lysosomal enzymes from dying cells can cause a destruction of the surrounding tissues<sup>9</sup>. The hypothesis of a labilization of the lysosomal membranes through the inflammatory process seems to be supported by our results. Since most of the acid phosphatase activity of cells is found within the lysosomes, it is possible that the permeability of the lysosomal membranes has become increased as a consequence of the gingival inflammation, with a liberation of the 'bound' fraction of the enzyme and consecutive diminution of the total intracellular activity.

Accumulation of lysosomal enzymes in the sulcular region could represent a possible mechanism for the formation of the periodontal pocket<sup>10</sup>.

**Résumé.** Les cellules épithéliales qui desquament au niveau de la gencive en contact avec la surface dentaire contiennent des concentrations de phosphatase acide plus faibles en présence d'inflammation et de destruction des

tissus parodontaux. Il est possible que la libération d'enzymes lysosomaux au niveau du sillon gingivodentaire soit une des causes de la formation de la poche parodontale.

A. CORNAZ<sup>11</sup>, G. CIMASONI<sup>11</sup> and A. PATAKI<sup>12</sup>

Dental School, University of Geneva,  
30, rue Lombard, CH-1211 Genève 4 (Switzerland); and  
Department of Toxicology, Sandoz Ltd.,  
CH-4133 Basel (Switzerland), 16 July 1973.

<sup>10</sup> Supported by a grant of the Swiss national fund for scientific research No. 3.663.71. We thank prof. J. CHAVEN, the M. and T. Kennedy Institute of Rheumatology, for his help through the course of this research.

<sup>11</sup> Dental School, University of Geneva, 30, rue Lombard, CH-1211 Genève 4 (Switzerland).

<sup>12</sup> Department of Toxicology, Sandoz S.A., CH-4133 Basel (Switzerland).

### Action de la synthèse protéique sur le transfert de la N-acetylglucosamine dans la muqueuse intestinale de rat

Nous avons montré dans de précédents travaux que les microsomes des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale de rat renfermaient une activité de transfert de la N-acetylglucosamine sur des accepteurs glycoprotéiques endogènes<sup>1</sup>.

Lorsque l'on recherche la localisation submicrosomique de cette N-acetylglucosaminyltransférase<sup>2</sup>, on observe qu'elle apparaît principalement dans la fraction des membranes agranulaires préparées selon la méthode de

DALLNER<sup>3</sup>; la très faible activité rencontrée dans la fraction des membranes granulaires pouvait être soit le résultat d'une contamination par les membranes agranulaires, soit la manifestation discrète d'une N-acetylglucosaminyltransférase responsable de l'incorporation de la première glucosamine qui joue le rôle de trait d'union entre les chaînes peptidique et polysaccharidique, et dont l'activité pourrait être accrue grâce à une synthèse protéique active.

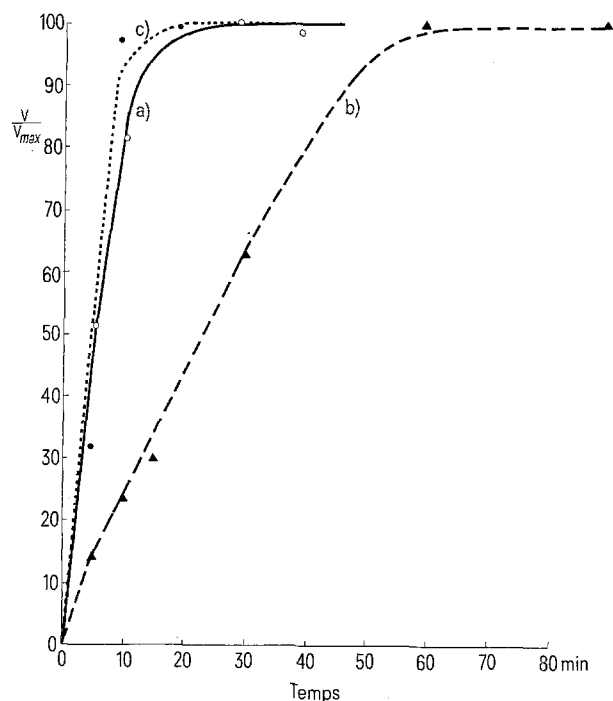
C'est cette dernière hypothèse que nous avons essayé de vérifier dans le travail que nous décrivons ici.

**Matériel et méthodes.** Les animaux sont des rats mâles de souche wistar pesant de 200 à 300 g, normalement nourris.

**Fractionnement cellulaire:** Les membranes granulaires ont été séparées des membranes agranulaires par la méthode de DALLNER<sup>3</sup> modifiée par KIM et al.<sup>4</sup> dans le tampon de LITTELFIELD et KELLER<sup>5</sup> contenant en plus 50 µg/ml de polyvinylsulfate de potassium.

**Techniques analytiques:** Les milieux acellulaires de synthèse protéique<sup>6</sup> comprennent pour un volume final de 0,450 ml, 100 µg de protéines des membranes granulaires, 750 µg de protéines de la fraction «pH 5 enzyme» préparée selon KELLER et ZAMECNIK<sup>7</sup>, 9 µmoles de phosphoenolpyruvate, 20 µg de pyruvate kinase (Boehringer), 5 µmoles de MgCl<sub>2</sub>, 30 µmoles de KCl, 0,5 µmole d'ATP, 0,05 µmole de GTP, 1 µmole de mercaptoéthanol, 1 µCi d'acides aminés <sup>14</sup>C (OB 4 (F) PR 80/68. 560 µCi/mg - CEA) ou 5 µg de chacun des 19 aminoacides froids et 0,05 µCi d'UDP-N-acetylglucosamine (NEN-Lot 483 156.)

Les incubations sont effectuées à 37°C et la radioactivité est mesurée sur des précipités par l'acide trichloracétique (concentration finale 10 %) recueillis sur filtre de verre whatman (GF/B), lavés par l'eau distillée puis par



Etude cinétique de l'incorporation a) d'acides aminés (<sup>14</sup>C) en milieu acellulaire de biosynthèse protéique. b) de N-acetylglucosamine en l'absence de synthèse protéique. c) de N-acetylglucosamine en présence de synthèse protéique. L'activité d'incorporation est exprimée en pourcentage de l'activité maximale Vo: a)  $3,5 \times 10^4$  cpm/mg de protéines; b) 40 cpm/mg de protéines; c) 400 cpm/mg de protéines.

<sup>1</sup> J. FROT-COUTAZ et R. GOT, *Biochimie* 53, 595 (1971).

<sup>2</sup> J. FROT-COUTAZ, P. DUBOIS, G. BERTHILLIER et R. GOT, *Expl. Cell Res.* 77, 223 (1973).

<sup>3</sup> G. DALLNER, *Acta path. microbiol. scand. Suppl.* 166, 1 (1963).

<sup>4</sup> Y. S. KIM, J. PERDOMO et J. NORDBERG, *J. biol. Chem.* 246, (17) 5466 (1971).

<sup>5</sup> J. W. LITTELFIELD et E. E. KELLER, *J. biol. Chem.* 224, 13 (1975).

<sup>6</sup> D. H. ALPERS et J. K. ISSELBACHER, *J. biol. Chem.* 242, 5617 (1967).

<sup>7</sup> E. B. KELLER et P. C. ZAMECNIK, *J. biol. Chem.* 221, 45 (1956).

un mélange méthylal/méthanol (4/1), séchés à l'étuve à 100°C, en présence de 5 ml de mélange scintillateur. PPO 5 g; diméthyl POPOP 0,3 g; toluène 1000 ml. Les protéines sont déterminées par la méthode de LOWRY<sup>8</sup>.

**Résultats.** Dans les conditions définies au paragraphe «Matériel et méthodes» et en présence des membranes granulaires, on obtient une synthèse peptidique dont la cinétique est représentée sur la Figure (courbe a). Cette courbe montre que la synthèse peptidique cesse au bout de 20 à 30 min d'incubation.

Si, après avoir réalisé une telle synthèse protéique pendant 30 min en remplaçant les acides aminés marqués par des acides aminés froids, on incube à nouveau pendant 30 min à 37°C, en présence d'UDP-N-acetylglucosamine <sup>14</sup>C, on n'observe qu'un accroissement très faible d'incorporation de N-acetylglucosamine par rapport à un témoin ne comportant pas les acides aminés non marqués; si l'on rapporte la radioactivité mesurée aux protéines de la fraction des membranes granulaires, on trouve une valeur de 40 cpm/mg.

Par contre, si l'UDP-N-acetylglucosamine est introduit dans le milieu en même temps que les acides aminés, on obtient 400 cpm/mg de protéines. Les études cinétiques du transfert de la N-acetylglucosamine sont données sur la Figure (courbe b): en l'absence de synthèse protéique (courbe c): en présence de synthèse protéique; on note une nette dissociation de ces 2 courbes cinétiques. Enfin la puromycine à la concentration 10<sup>-3</sup> M abaisse la synthèse protéique d'un facteur 2,5 et le transfert de N-acetylglucosamine d'un facteur 1,9.

**Discussion.** Nous avons mis en évidence une activité de transfert de la glucosamine qui semble dépendante de la synthèse protéique; cette N-acetylglucosaminyltransférase présente les particularités suivantes: d'une part elle est inhibée par la puromycine avec un taux d'inhibition voisin de celui observé pour la synthèse protéique, d'autre part elle est localisée dans les membranes granulaires. La contamination de cette fraction par l'appareil de golgi qui renferme une autre N-acetylglucosaminyltransférase mais non inhibée par la puromycine n'est que de 1%<sup>2-9</sup>. On peut donc la considérer comme responsable

du transfert de la première glucosamine établissant la liaison peptide-glucide.

Une synthèse protéique préalable est sans action sur elle; au contraire, si on réalise en même temps une synthèse protéique et le transfert du résidu glucidique, l'activité de cette N-acetylglucosaminyltransférase est nettement augmentée. Il semblerait que ce transfert ne puisse se produire qu'à un moment précis de la synthèse de la chaîne peptidique acceptrice. On sait que cette dernière acquiert très vite une structure tridimensionnelle<sup>10</sup> alors même qu'elle est toujours liée aux ribosomes, cette dernière évoluant à mesure que la synthèse se poursuit. On peut alors supposer qu'au cours de cette évolution, la chaîne peptidique se trouve dans des conditions favorables au fonctionnement de la glucosaminyltransférase voisine, soit par une position spatiale idoine, soit en démasquant le triplet-asparagine-x-sérine (ou théorine) – qui constituerait le signal de transfert. Ces conditions seraient fugitives, c'est pourquoi une synthèse protéique a priori augmente la quantité de chaînes peptidiques acceptrices mais pas les capacités réelles de transfert du système.

**Summary.** The present report is concerned with an N-acetylglucosaminyltransferase which catalyzes the transfer of N-acetylglucosamine from UDP-N-acetylglucosamine to nascent protein chains. This enzyme is localized in a rough microsomes fraction prepared according to the method of DALLNER<sup>3</sup>.

J. FROT-COUTAZ et R. GOT

Laboratoire de Biochimie des Membranes, E.R. No. 66,  
43, Boulevard du 11 Novembre 1918,  
F-69621 Villeurbanne (France), 16 juillet 1973.

<sup>8</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

<sup>9</sup> J. FROT-COUTAZ, Thèse de Doctorat es Sciences, No. 131, Lyon (1972).

<sup>10</sup> D. C. PHILLIPS, Scient. Am. 215, 78 (1966).

## Variation in Trehalase Activity in the Fat Body, Intestine and Haemolymph of *Philosamia ricini* (Eri-Silkworm) During Development

Presence of trehalase was first demonstrated by FREREJACQUE<sup>1</sup> in insects that feed on fungi. This enzyme brings about the hydrolysis of trehalose, a non-reducing disaccharide, to glucose whereby trehalose participates in various metabolic activities indirectly in the hydrolyzed form. The occurrence of trehalase in different tissues of various insects with a predominant activity in the salivary gland and intestine has been reported by many investigators<sup>2-16</sup>. While its presence in insect haemolymph or fat body has been demonstrated by HOWDEN and KILBY<sup>17</sup> and others<sup>2,13,16</sup>, DERR and RANDALL<sup>4</sup> have reported its absence in both these insect tissues. Absence of trehalase in insect haemolymph, as reported by many<sup>2,14,16,18</sup>, could be attributed to the presence of inhibitors in the haemolymph<sup>19</sup>. Decline in blood trehalose level accompanied with high trehalase activity has been shown to be associated with a process requiring energy and with another for providing substrate for chitin synthesis<sup>19</sup>.

*Philosamia ricini* fat body<sup>20</sup>, as well as the entire larval tissue homogenate<sup>21</sup>, have been observed to exhibit elevated glycogen level during larval development and a decline during larval-pupal transformation and early

pupal period, followed by a slight increase till ecdysis. The variations in glycogen level could possibly be correlated with the variations in active phosphorylase activity. Coupled with this, a variable pattern obtained for total haemolymph carbohydrate of *Philosamia ricini* (PANT and LACY, unpublished data) induced us to study the variations in trehalase activity of different tissues of *Philosamia ricini*, an insect of economic importance in Indian Silk Industry, during development.

**Materials and methods.** Rearing of *Philosamia ricini* was carried out as described by PANT and LACY<sup>22</sup>. Tissue homogenates of larvae and pupae were made as described earlier<sup>20</sup>. Larval haemolymph was collected as described by PANT and AGRAWAL<sup>23</sup>. Trehalase activity was assayed as described by DAHLQVIST<sup>24</sup> and DERR and RANDALL<sup>4</sup> by estimating the rate of trehalose hydrolysis. The assay system, consisting of trehalose solution (0.6 ml, 0.14 M), phosphate buffer (2.1 ml, 0.1 M, PH 5.6) and enzyme solution (0.3 ml) or haemolymph (0.05 ml) was incubated at 30°C for 30 min, after which the reaction was stopped by heating the tubes in a boiling water bath for 5 min. The glucose released was estimated by employing glucose