

$[\alpha]_D +155^\circ$, 0.2% in CHCl_3) which was identical with $(-)\text{-}\alpha\text{-gurjunene}$ ($[\alpha]_D -227^\circ$) except that the sign of the optical rotation was opposite¹³. Thus, this tricyclic α,β -unsaturated ketone was estimated as enantiomeric $(+)\text{-cyclocolorenone}$ (II).

¹³ M. PALMADE, P. PESNELLE, J. STREITH and G. OURISSON, Bull. Soc. Chim. fr. 1963, 1950.

¹⁴ Acknowledgment. The authors wish to express their gratitude to Mr. T. ONO for the collection and identification of the liverwort. Thanks are also due to Profs. G. BÜCHI and V. HEROUT for the gifts of samples of maali oxide and IR-spectrum of cyclocolorenone.

Zusammenfassung. Aus den Hexanextrakten von *Plagiochila acanthophylla* subsp. *japonica* wurden $(-)$ -Maali oxid und $(+)$ -Cyclocolorenon isoliert. Diese Verbindungen sind enantiomer zu denjenigen, die aus höheren Pflanzen erhalten worden sind.

A. MATSUO, M. NAKAYAMA, S. SATO, T. NAKAMOTO, S. UTO and S. HAYASHI¹⁴

Department of Chemistry, Faculty of Science,
Hiroshima University, Hiroshima 730 (Japan),
13 September 1973.

Activité phosphatasique acide chez *Saprolegnia monoïca* Pringsheim

La régulation de l'activité phosphatasique par la concentration d'orthophosphate dans le milieu de culture a été décrite chez de nombreux organismes. La présence de grande quantité de phosphate réduit l'activité enzymatique des levures (WEINBERG et ORTON¹; SCHURR et YAGIL²; TOUIMI, BENJELLOUN et BONALY³) et provoque aussi la disparition de certaines isoenzymes chez *Aspergillus nidulans* (DORN et RIVERA⁴) et *Neurospora crassa* (HOCHBERG et SARGENT⁵).

Le fluorure de sodium est un inhibiteur, in vitro, des activités phosphatasiques acides. Ainsi chez *Dictyostelium discoideum* à la concentration de 0,03 M, il inhibe 92 à 95% de l'activité enzymatique (GEZELIUS⁶). Mais l'action de cet inhibiteur varie selon l'origine des enzymes: 53% d'inhibition pour celles du foie, 96% pour celles de la prostate et 8% pour celles des érythrocytes, mais aussi selon les pH, révélant ainsi l'existence d'isoenzymes plus ou moins sensibles (PEARSE⁷).

A la concentration de 2 g/l, cet inhibiteur provoque une forte diminution de la vitesse de croissance des hyphes de *Saprolegnia monoïca* sans toutefois affecter le phénomène de ramification (FEVRE⁸).

Nous avons voulu voir si le fluorure de sodium (NaF) perturbe l'activité phosphatasique acide quand il est additionné au milieu de culture, et avons comparé son effet à celui d'un inhibiteur connu de la synthèse des protéines⁹, la DL-parafluorophénylalanine (DLpFPA).

Matériel et méthodes. La souche de *Saprolegnia monoïca* Pringsheim N° 53967 Dick a été obtenue au Centraal Bureau voor Schimmelcultures de Baarn. La culture en milieu liquide est faite sur milieu synthétique de MACHLIS⁹. Après croissance à 25°C pendant 4 jours, les mycéliums sont récupérés par filtration, lavés à l'eau distillée stérile puis lyophilisés. Les protéines sont extraites dans du tampon Tris pH 7,4, en présence de sable de quartz et

les analyses sont faites avec les surnageants issus des centrifugations à 25000 g. L'activité enzymatique est déterminée par la mesure à 420 nm du paranitrophénol libéré (méthode de SCHURR et YAGIL²) à partir du substrat paranitrophényl phosphate (1 mg/ml) dissout dans du tampon acétate pH 4. A 1 ml de la solution de substrat est additionné 0,5 ml d'extrait protéique. Après incubation de 30 à 60 min à 30°C, la réaction est stoppée et la coloration révélée par addition de 2 ml de soude normale.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide ont été menées selon la technique de DAVIS¹⁰. La révélation des bandes à activité phosphatasique est faite selon la méthode de BREWBAKER¹¹. Les gels sont mis à incuber dans la solution suivante: 100 ml de tampon acétate pH 5, 1 g de NaCl, 0,250 g polyvinyl pyrrolidone, 0,100 g de 6 benzoyl-2-naphtylphosphate, 0,1 g fast blue Base salt et 10 gouttes KCl 10%. Les enregistrements photodensitométriques sont faits à l'aide d'un appareil Vitatron.

Résultats. Les cultures réalisées en présence de fluorure de sodium possèdent une activité phosphatasique très faible, 8 à 13% des témoins, comparés au taux de protéines globales présentes dans le mycélium (64,2 des témoins). Il semble y avoir une inhibition sélective de ces enzymes (ou de leur activité) indépendante de l'action du NaF comme inhibiteur des synthèses protéiques (SAMESHIMA¹²) (Tableau I). Au contraire la DLpFPA inhibe d'une manière comparable l'activité enzymatique et la synthèse des protéines (Tableau I).

Connaissant l'action in vitro du NaF, il est possible d'envisager que l'inhibiteur réduise seulement l'activité des enzymes tout en épargnant leur synthèse. La mise en présence du NaF et des phosphatases acides serait particulièrement efficace au cours des processus d'extraction masquant ainsi au cours des tests la véritable activité enzymatique.

Tableau I. *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. Activité phosphatasique suivant les conditions de culture

Milieu de culture	Activité phosphatasique acide (%)	Protéines/mg mycélium (%)
Témoin	100	100
+ NaF (2 g/l)	{ 8,4 13,6	64,2
+ DL para fluoro phénylalanine (0,1 g/l)	51,3	48
Phosphates (0,2 g/l)	239	40

¹ R. WEINBERG and W. L. ORTON, J. Bact. 86, 805 (1963).

² A. SCHURR et E. YAGIL, J. gen. Microbiol. 65, 291 (1971).

³ A. TOUIMI BENJELLOUN et R. BONALY, C. r. Acad. Sci., Paris (D) 276, 2089 (1973).

⁴ G. DORN et W. RIVERA, J. Bact. 92, 1618 (1966).

⁵ M. L. HOCHBERG et M. L. SARGENT, Analyt. Biochem. 57, 516 (1973).

⁶ K. GEZELIUS, Arch. Mikrobiol. 85, 51 (1972).

⁷ A. G. E. PEARSE, *Theoretical and Applied Histochemistry*, 3e edn. (J. A. Churchill, London 1968), p. 547.

⁸ M. FEVRE, Z. Pflanzenphysiol. 68, 1 (1972).

⁹ L. MACHLIS, Am. J. Bot. 40, 449 (1953).

¹⁰ B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

¹¹ J. L. BREWBAKER, M. D. UPADHYA, Y. MAKINEN et MACDONALD, Physiologia Plant. 21, 930 (1968).

¹² M. SAMESHIMA, K. ITO et M. IWABUCHI, Biochim. biophys. Acta 281, 79 (1972).

Tableau II. *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. Action du fluorure de sodium sur l'activité phosphatasique acide

Milieu de culture	Activité phosphatasique acide (%)			
	Après extraction (A)	Après stockage (40 h à -20°C)	Après dialyse contre H ₂ O (40 h à 4°C (B))	Rapport B/A
Témoin	100	91,7	92,9	0,91
	100	92,8	93,9	0,92
+ NaF (2 g/l)	8,4	8,3	216	25,7
	13,6	15	277,5	20,4

Activités enzymatiques et quantité de protéines des témoins sont ramenées à 100% et servent de référence pour la comparaison avec les autres cas.

Pour répondre à ces questions, nous avons dialysé les extraits protéiques contre l'eau distillée pendant 40 h à 4°C, afin d'éliminer le NaF présent. Chez les témoins, le stockage des extraits au froid ou la dialyse provoque après cette période une perte d'activité assez faible (moins de 10%). Par contre, pour les cultures obtenues en présence NaF, l'activité décelée après dialyse est de 20 à 25 fois supérieure à celle des extraits stockés au froid et à ceux utilisés aussitôt après extraction. Dans chaque cas cette activité est supérieure à celle trouvée chez les témoins (Tableau II). Ainsi le fluorure de sodium bloque l'activité des phosphatases acides qui sont présentes en plus grande quantité que chez les témoins.

Pour savoir si la plus grande activité enzymatique décelée après dialyse correspond à une stimulation de synthèses d'isoenzymes déjà présents ou à l'apparition de nouvelles molécules enzymatiques, nous avons révélé les activités phosphatasiques après électrophorèse sur gel de polyacrylamide des extraits protéiques (Figures 1 et 2).

Chez les témoins, il est possible de déceler deux bandes a) et b) d'activité enzymatique. Chez les cultures réalisées en présence de NaF, le profil enzymatique est différent avec la perte de la bande a), le renforcement d'activité de la zone b) et l'apparition d'une nouvelle zone c). Par contre la DLpFPA ne modifie pas la composition enzymatique et l'on retrouve les bandes a) et b) présentes chez les témoins.

Après électrophorèse des extraits protéiques des cultures témoins et des cultures faites en présence de NaF, l'addition de fluorure de sodium (2 mg/ml) au milieu d'incubation des gels, provoque la presque totale disparition de l'activité enzymatique et seule la bande b) est encore décelable (Figures 1 et 2). Ceci tendrait à prouver que seule l'activité de l'isoenzyme b) est dosée dans les

extraits non dialysés des cultures réalisées en présence de NaF.

Ainsi le fluorure de sodium inhibe l'activité phosphatasique acide mais provoque l'apparition d'une isoenzyme et la disparition d'une autre.

Dès cultures réalisées sur milieu contenant peu de phosphate (0,2 g/l de KH₂PO₄ contre 1,36 pour les témoins) possèdent une activité phosphatasique plus de deux fois supérieure à celle des témoins (Tableau I). Après électrophorèse, on peut déceler les 3 isoenzymes a), b), c), et un renforcement général de leur activité (Figures 1 et 2). La carence en phosphate ou la présence de NaF dans le milieu de culture provoque l'apparition de l'isoenzyme c) absente dans le cas des cultures témoins.

Discussion. La présence de fluorure de sodium dans le milieu de culture provoque une forte inhibition de l'activité phosphatasique acide des extraits protéiques de *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. Cependant l'action de cet inhibiteur est plus marquée sur le fonctionnement que sur la synthèse des enzymes car après dialyse les activités enzymatiques dosées sont plus fortes que chez les témoins.

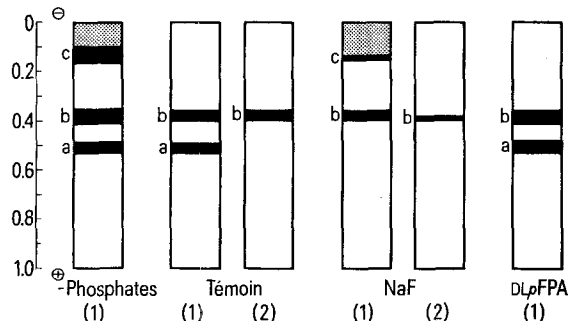


Fig. 1. *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. Phosphatases acides révélées après électrophorèse en gel de polyacrylamide. 1. Milieu d'incubation normal. 2. Milieu d'incubation plus NaF (2 mg/ml).

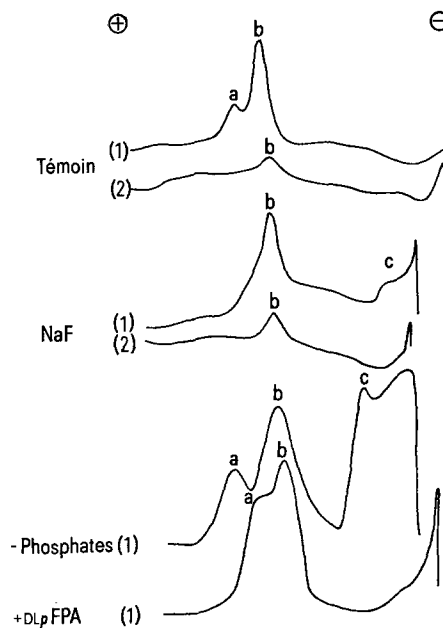


Fig. 2. *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. Enregistrements photodensitométriques des activités phosphatasiques acides. 1. Après incubation dans un milieu normal. 2. Après incubation en présence de NaF (2 mg/ml).

Le NaF modifie aussi le profil enzymatique par l'apparition de l'isoenzyme c) dont la synthèse est fonction de la quantité de phosphates du milieu de culture. En présence d'une grande quantité de phosphates cette isoenzyme est absente mais apparaît dans le cas d'une carence. Il est possible que le NaF en inhibant les activités phosphatasiques place le mycélium dans des conditions de carence en phosphates et entraîne la dérépression de l'isoenzyme c). La NaF, en empêchant les réactions enzymatiques pourrait laisser intact dans le mycélium un substrat non métabolisé capable alors de réprimer l'enzyme a).

Nous n'avons pas déterminé ni précisé le type de phosphatase acide qui serait soumis à une telle régulation. Mais HEREDIA¹³ distingue chez les levures deux types de phosphomonoestérases à rôle physiologique différent, l'une étant répressible et dépendante du phosphate externe, l'autre constitutive interviendrait dans le métabolisme intermédiaire.

Summary. NaF inhibits the phosphatase activities of mycelium *Saprolegnia monoïca* but brings about the repression of isozyme c, as does a phosphate deficiency. DLpFPA inhibits in a same manner the enzymatic phosphatase activity and the protein synthesis.

M. FEVRE

Laboratoire de Physiologie végétale et Laboratoire de Mycologie associée au C.N.R.S. N° 44, Université de Lyon I, 43, Boulevard du 11 Novembre 1918 F-69621 Villeurbanne (France), 4 Septembre 1973.

¹³ C. F. HEREDIA, F. YEN et A. SOLS, Biochem. biophys. Res. Commun. 10, 14 (1963).

¹⁴ Je remercie Monsieur le Professeur G. TURIAN (Université de Genève) pour les critiques et suggestions fructueuses formulées au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Effect of Low Protein Diet and Hyperammonemia on Liver Glutaminase Activity in the Rat¹

Liver glutaminase effects release of ammonia from the amide group of glutamine for carbamyl phosphate action in the production of urea. As has been established for many other enzymes involved in amino acid catabolism, the activity of glutaminase decreases markedly during low protein intake².

Lack of glutaminase was once suggested to be the basic defect in lysinuric protein intolerance (LPI)³⁻⁸. This is an autosomal recessive disease⁹ characterized by heavy lysinuria and amino nitrogen induced hyperammonemia. The patients have minimal protein intake because a strong aversion to protein is associated with the periodic hyperammonemia. Decreased liver glutaminase activity would be expected in LPI secondary to the restricted ingestion of protein, even if it was not the primary defect. In a previous work, the activity of glutaminase I, the major hepatic glutaminase, was determined in the liver of 2 LPI patients¹⁰. Surprisingly, an increased activity was found. Evidently some factor is involved, which tends to increase the glutaminase activity and exceeds the opposite effect of low protein intake. To assess the role of the periodic hyperammonemia, rats were kept on low protein diet and exposed intermittently to hyperammonemia, and the effect on liver glutaminase I activity was determined.

45 male Sprague-Dawley rats were divided into 4 experimental groups as shown in Table I. 2 of the groups received standard laboratory rat chow, with high quality protein 24.6% of the wet weight. The other 2 groups were placed on a low protein diet (Table II), containing 6% protein of the wet weight. Continuous free access to the

diet and water was provided. The experiment lasted 14 or 21 days (Table I). One of the groups on each diet received i.p. injections of ammonium acetate 2 to 3 times daily for the 7 last days of the experiment. The single doses of ammonium acetate were 0.6 mmoles per kg in 0.1 M solution, which is 56% of the rat LD₅₀^{9,99} and 73% of the LD₅₀¹¹. The blood ammonia concentration, measured in 5 animals 1 h after the dose, ranged from 186 to 1090 μ M (mean 427 μ M), which is clearly above the upper limit of normal¹². The animals were then decapitated, a segment

¹ This work was supported by The National Research Council for Medical Sciences, and the Foundation for Pediatric Research, Finland.

² J. R. BEATON, Can. J. Biochem. 41, 1871 (1963).

³ J. PERHEENTUPA and J. K. VISAKORPI, Lancet 2, 813 (1965).

⁴ M. KEKOMÄKI, J. K. VISAKORPI, J. PERHEENTUPA and L. SAXÉN, Acta paed. scand. 56, 617 (1967).

⁵ M. KEKOMÄKI, E. TOIVAKKA, V. HÄKKINEN and M. SALASPURO, Acta med. Scand. 183, 357 (1968).

⁶ M. KEKOMÄKI, N. C. R. RÄIHÄ and J. PERHEENTUPA, Acta paed. scand. 56, 631 (1967).

⁷ J. MALMQUIST and B. HETTER, Lancet 2, 129 (1970).

⁸ J. MALMQUIST, R. JAGENBURG and J. LINDSTEDT, New Engl. J. Med. 284, 997 (1971).

⁹ R. NORIO, J. PERHEENTUPA, M. KEKOMÄKI and J. K. VISAKORPI, Clin. Genet. 2, 214 (1971).

¹⁰ O. SIMELL, J. PERHEENTUPA and J. K. VISAKORPI, Pediat. Res. 6, 797 (1972).

¹¹ J. P. GREENSTEIN, M. WINITZ, P. GULLINO and S. M. BIRNBAUM, Arch. Biochem. Biophys. 59, 302 (1955).

¹² M. WINITZ, J. P. DE RUISSEAU, M. C. OTEY, S. M. BIRNBAUM and J. P. GREENSTEIN, Arch. Biochem. Biophys. 64, 368 (1956).

Table I. Effect of low protein diet^a and ammonium acetate treatment^b on the growth of rats

Treatment	Number of animals ^a	Weight at the beginning of the experiment mean \pm SD (g)	Change in weight per day during experiment mean \pm SD (g)
I Normal diet	11 (3)	154.7 \pm 10.8	3.39 \pm 0.49
II Normal diet and ammonium acetate	15 (8)	162.1 \pm 14.8	1.48 \pm 0.82
III Low protein diet	7 (3)	156.7 \pm 3.1	-0.08 \pm 0.17
IV Low protein diet and ammonium acetate	12 (8)	157.2 \pm 10.0	-0.45 \pm 0.31

^a The experiment lasted 21 days, but some animals (numbers given in parentheses) received the diet for only 14 days. ^b Ammonium acetate was given i.p. for 7 days before the end of the experiment 2 to 3 times daily, a single dose being 0.6 mmoles per kg of ammonium acetate in 1.0 M solution.