

ty. Therefore, it is concluded that the 24-h change observed in DBH activity in human serum may be specific for the enzyme derived from the sympathetic nerves.

In conclusion, DBH activity in human serum has a small but significant 24-h rhythm, being higher at daytime and lower at night. This 24-h rhythm may be due to an increased physical activity or due to an erect posture during daytime, and sleep itself may have little effect on the enzyme activity.

**Zusammenfassung.** Nachweis, dass die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase im menschlichen Serum einen Tag-Nacht-

Rhythmus aufweist, wobei die Nachtaktivität im Verhältnis zu derjenigen des Tages reduziert ist.

T. OKADA, T. FUJITA, T. OHTA,  
T. KATO, K. IKUTA and T. NAGATSU

*Department of Neuropsychiatry, Faculty of Medicine,  
University of Nagoya, Nagoya (Japan), and  
Department of Biochemistry, School of Dentistry,  
Aichi-Gakuin University, Nagoya 464 (Japan),  
14 December 1973.*

## Activité de la monoamine-oxydase au cours de la période peri-natale chez le Lapin

De nombreuses publications décrivent les changements de l'activité de la monoamine-oxydase (MAO; EC. 1.4.3.4.) au cours de la croissance. Certaines d'entre elles montrent que la distribution des différentes formes de l'enzyme, qui semble être particulière à chaque organe, varie avec l'âge de l'animal<sup>1</sup>. Très souvent les dosages ne concernent que le développement post-natal, ce qui délaisse deux périodes que l'on sait être importantes dans l'évolution de nombreuses activités enzymatiques<sup>2</sup>: la fin de la période fœtale et la période néonatale. D'autre part, le lapin a été très peu étudié de ce point de vue; toutefois, l'évolution de l'activité MAO a été étudiée dans plusieurs régions du cerveau, à partir du stade de 3 jours<sup>3</sup>: à cet âge, l'activité enzymatique est déjà sensiblement égale ou supérieure à celle de l'adulte, selon la région étudiée.

La présente étude a été entreprise pour établir l'évolution de l'activité MAO dans trois organes du Lapin pendant la fin de la vie fœtale, la naissance et le début de la vie post-natale.

**Matériel et méthodes.** Des lapins Néo-Zélandais ont été utilisés chez lesquels la durée de la gestation est de 31 jours. Les nouveau-nés (N) correspondent à des animaux nés depuis 1 min, 1 h et 2 h et le stade de 0 jour correspond à des animaux âgés de  $12 \pm 3$  h. Les fœtus sont prélevés dans l'utérus, après anesthésie de la mère au pentobarbital (0,5 ml/kg d'une solution à 6%). Fœtus

et nouveau-nés sont tués par décapitation et les organes sont immédiatement prélevés et placés dans du KCl 0,14 M à 4°C. Les échantillons sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . L'activité MAO est dosée par la méthode de WURTMAN et AXELROD<sup>4</sup> utilisant de la tryptamine-bisuccinate comme substrat. Les résultats sont exprimés en nmoles de produit formé (acide indole-acétique) par 20 min et par g de tissu frais  $\pm$  l'intervalle de confiance calculé pour  $P$  0,05. Pour chaque stade, les fœtus ou nouveau-nés proviennent d'au moins trois portées différentes (6 portées pour le stade Naissance).

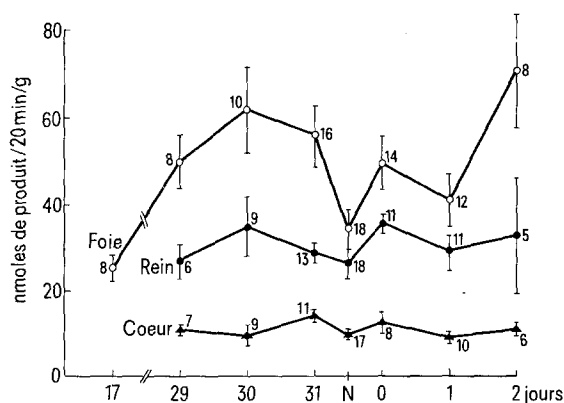
**Résultats.** La Figure présente l'évolution de l'activité MAO de 29 j de vie fœtale à 2 j de vie néo-natale. Pour le foie, l'activité de l'enzyme a été dosée également chez des fœtus de 17 j.

L'activité du foie double entre 17 et 29 j; le taux d'accroissement global de l'activité enzymatique pendant ces 12 jours est nettement inférieur à celui de la période 29–30 j. A 30 j., l'activité du foie fœtal a atteint celle de l'adulte qui est de  $68,5 \pm 8$  nmoles/20 min/g. A 2 j de vie post-natale, l'activité du rein est encore très inférieure à celle de l'adulte ( $88 \pm 25$  nmoles/20 min/g pour le cortex et  $164,6 \pm 67,7$  nmoles/20 min/g pour la médulla).

Tout au long de la période étudiée, les activités du foie et du rein évoluent de façon très comparable: elles augmentent entre 29 et 30 j, entre la naissance et 0 j (les activités mesurées dans les 3 organes restent constantes après 1 min, 1 h et 2 h de vie post-natale) et entre 1 et 2 j. Elles diminuent entre 31 j et la naissance et entre 0 et 1 j.

A 29 j, l'activité enzymatique du cœur a atteint le niveau de l'adulte ( $10,5 \pm 1,3$  nmoles/20 min/g). A partir de 31 j elle suit la même évolution que celles du foie et du rein, mais l'amplitude des variations observées est très faible.

**Discussion.** Les variations de l'activité enzymatique des 3 organes présentent des analogies telles que l'on peut penser que les causes qui les déterminent sont les mêmes. Par contre, les niveaux d'activité atteints en fin de vie fœtale suggèrent une distribution hétérogène dans ces 3 organes au cours du développement de la forme ou des formes de la MAO dosées par la méthode utilisée c'est à dire celles qui dégradent à une vitesse appréciable la tryptamine.



Activité MAO au cours de la période peri-natale exprimée en nmoles de produit formé en 20 min et par g de tissu frais  $\pm$  intervalle de confiance calculé pour  $P$  0,05. N, naissance. Les nombres situés à côté des points indiquent le nombre de cas. Différences statistiquement significatives: Foie, 31 j et N:  $P < 0,001$ ; 0 j et 1 j:  $P < 0,05$ . Rein, 30 j et N:  $P < 0,02$ ; 0 j et 1 j:  $P < 0,01$ . Cœur, 31 j et N:  $P < 0,001$ ; 0 j et 1 j:  $P < 0,001$ .

<sup>1</sup> S. EIDUSON, in *Monoamine Oxidase New Vistas* (Eds. E. COSTA et M. SANDLER; Raven Press, New York 1972), p. 271.

<sup>2</sup> O. GREENGARD, in *Biochemical Actions of Hormones* (Ed. G. LITWACK; Academic Press, New York 1970), p. 53.

<sup>3</sup> R. E. McCAMAN et M. H. APRISON, *Progr. Brain Res.* 9, 220 (1964).

<sup>4</sup> R. J. WURTMAN et J. AXELROD, *Biochem. Pharmac.* 12, 1439 (1963).

D'une façon générale, l'activité MAO du nouveau-né de Lapin est plus proche de celle de l'adulte que celle du Rat nouveau-né<sup>5</sup>. Cela rend vraisemblablement compte des différences de maturité physiologique des nouveau-nés de ces deux espèces. Une diminution de l'activité MAO a déjà été mentionnée, au moment de l'éclosion chez le Poulet<sup>6</sup> et au moment de la naissance dans plusieurs organes du Rat<sup>5,7,8</sup>. Chez le Lapin, ce phénomène est particulièrement net et se reproduit au moins dans 3 organes de façon synchrone. Comme chez le Rat<sup>5</sup> deux chutes successives ont lieu au voisinage de la naissance.

Il est difficile de déterminer les causes précises de ces diminutions d'activité puisque, d'une part de nombreux paramètres physiologiques varient au moment de la naissance et que, d'autre part, l'activité MAO est soumise à de multiples influences et en particulier à un contrôle hormonal. Ces diminutions ne semblent pas pouvoir être des artefacts dus au mode d'expression des résultats. Il semble en tous cas que les chutes observées sont trop rapides pour résulter de variations de la teneur en eau des tissus ou d'une diminution de la synthèse de l'enzyme. Des variations des conditions physico-chimiques intracellulaires ne semblent pas pouvoir non plus être en cause puisque le dosage est fait *in vitro* dans des conditions standardisées. Ces diminutions peuvent par contre s'expliquer par l'intervention d'inhibiteurs ou la disparition d'activateurs de l'activité enzymatique chez le nouveau-né. C'est ainsi que l'on connaît l'effet inhibiteur des hormones thyroïdiennes<sup>9</sup> et des glucocorticoïdes<sup>10,11</sup> sur l'activité MAO et l'on sait qu'au moment de la naissance, la thyroïde du Rat est activée<sup>12</sup> et le taux plasmatique de glucocorticoïdes est élevé chez le Rat, le Lapin et le Cobaye<sup>13</sup>. Enfin ces diminutions mesurées *in vitro* sont probablement des sous-estimations des chutes qui se produisent *in vivo*. En effet, l'activité MAO subit en plus l'effet de l'hypoxie néonatale et l'on sait que la teneur en oxygène influence cette activité<sup>14,15</sup>.

**Summary.** The activity of enzyme monoamine oxidase was studied from 3 days before birth up to 2 days after birth in the heart, liver and kidney of albino rabbits. At the end of foetal life, the MAO activity of heart and liver expressed per unit of organ weight was nearly the same as the adult one. At birth and 1 day, the activity showed decrease in the 3 organs. The possible causes of these decreases are discussed.

D. GRIPOIS et J. ROFFI<sup>16</sup>

*Université Paris XI, Laboratoire d'Endocrinologie,  
Bâtiment 491, F-91405 Orsay (France),  
24 septembre 1973.*

<sup>5</sup> D. GRIPOIS et J. ROFFI, *Annls Biol. anim. Biochim. Biophys.* 12, 631 (1972).

<sup>6</sup> L. IGNARRO et F. E. SHIDEMAN, *J. Pharmac. exp. Ther.* 159, 29 (1968).

<sup>7</sup> D. S. BENNETT et N. J. GIARMAN, *J. Neurochem.* 12, 911 (1965).

<sup>8</sup> J. SKALA et O. LINDBERG, *Int. J. Biochem.* 1, 513 (1970).

<sup>9</sup> A. SPINKS et J. H. BURN, *Br. J. Pharmac. Chemother.* 7, 93 (1952).

<sup>10</sup> V. M. AVAKIAN et B. A. CALLINGHAM, *Br. J. Pharmac. Chemother.* 33, 211 P (1968).

<sup>11</sup> H. PARVEZ et S. PARVEZ, *C.r. Acad. Sci., Paris* 274, 919 (1972).

<sup>12</sup> W. H. FLORSHEIM, M. A. FAIRCLOTH, N. L. CORCORAN et P. RUDKO, *Acta endocr., Copenh.* 52, 375 (1966).

<sup>13</sup> K. W. MALINOWSKA, R. N. HARDY et P. W. NATHANIELSZ, *Experientia* 28, 1366 (1972).

<sup>14</sup> H. I. KOHN, *Biochem. J.* 31, 1693 (1937).

<sup>15</sup> P. BASTIDE, J. BAUDON, M. CARCASSIN et G. DASTUGUE, *Biologie méd.* 49, 467 (1960).

<sup>16</sup> Remerciements. Nous remercions MM. les Professeurs CHEVALLIER et JOST de nous avoir permis d'utiliser certains appareils de leur laboratoire.

## Chromatography of some Human Glycoproteins on DEAE-Sephadex A-25

The DEAE-Sephadex anion exchangers have a high capacity and low nonspecific adsorption. They are therefore extremely useful for column chromatography in the biochemical field.

The Sephadex anion exchanger A-25 is the more highly crosslinked gel and has a high capacity for low molecular

weight fraction – to 10,000<sup>1</sup>, although other applications are also known<sup>2</sup>. The DEAE-Sephadex A-50 is suitable for larger molecules and finds wide application in fractionating and preparing a great number of plasma proteins<sup>3–5</sup>.

In this investigation, human serum was fractionated by column chromatography on DEAE-Sephadex A-25. The fractions were determined by measuring optical density and characterized by specific methods.

**Material and methods.** Normal human serum was obtained from 10 human donors and then pooled. Dry DEAE-Sephadex A-25 medium (AB Pharmacia, Uppsala) was suspended in distilled water and washed with 0.5 M HCl, followed by water, then treated with 0.5 M NaOH and washed with water several times. Neutralization was made with 0.5 M CH<sub>3</sub>COOH. Finally the material was washed with 0.02 M phosphate buffer (pH = 6.6).

A glass column (1.5 × 20.0 cm) before packing was filled with phosphate buffer in which the gel was poured.

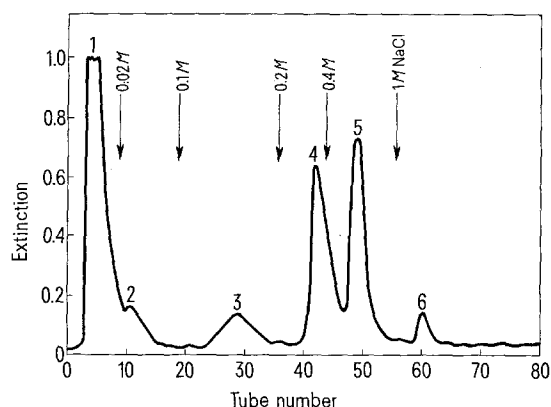


Fig. 1. Effluent diagram of normal human serum proteins chromatographed on DEAE-Sephadex A-25. Elution was started with 0.02 M phosphate buffer (pH 6.6) followed by a system of increasing molarity of NaCl.

<sup>1</sup> J. PORATH and E. B. LINDER, *Nature, Lond.* 191, 69 (1961).

<sup>2</sup> B. GELOTTE, P. FLODIN and J. KILLANDER, *Arch. Biochem. Biophys., Suppl.* 1, 319 (1962).

<sup>3</sup> L. GOODFRIEND, L. PERELMUTTER and B. ROSE, *Nature, Lond.* 205, 718 (1965).

<sup>4</sup> A. RIMON and Y. SHAMASH, *Biochim. biophys. Acta* 121, 26 (1966).

<sup>5</sup> K. HIWADA, H. AKUTSU, S. FUJIMOTO, T. KOKUBU and Y. YAMAMURA, *Clin. chim. Acta* 14, 410 (1966).