

3. The comparison of cysteamine with the structure analogues 2-aminoethanol and mercaptoethanol showed that the inhibiting effect was lost when either the sulfhydryl (SH) group or the amino ( $\text{NH}_2$ ) group was replaced by a hydroxyl (OH) group (Table II, No. 1, 2 and 3). From these results one must conclude that the inhibition by cysteamine requires the common presence of the SH and  $\text{NH}_2$  group. This interpretation is also supported by the strong inhibiting effect of cystamine (No. 4) though this substance has no free SH group. However, the disulfide group of cystamine becomes rapidly reduced in vivo<sup>12,13</sup> and, in the presence of living tissue and cells, also in vitro<sup>14</sup>.

These findings are in correspondence with the conjecture<sup>2</sup> that the inhibition by cysteamine of the 11  $\beta$ -hydroxylase is caused by the formation of mixed disulfides. According to ELDJARN and PIHL<sup>15</sup>, only the radioprotective thiols and disulfides are able to form mixed disulfides. From this point of view, the corresponding behaviour of cysteamine and cystamine in radioprotection (for ref. see BACQ<sup>16</sup>) and 11  $\beta$ -hydroxylase inhibition is remarkable. The suggested role of mixed disulfide formation for the inhibition of the 11  $\beta$ -hydroxylase is supported by the inactivity of cysteine (Table II, No. 5) that is unable to form mixed disulfides and to exert substantial radioprotection in vivo.

Unlike substances with one SH group, substances carrying two SH groups showed a significant 11  $\beta$ -hydroxylase inhibition (Table II, No. 6 and 7). However, the effect of these substances was much weaker than that of cysteamine and cystamine. This weakness in hydroxylase inhibition is paralleled by an inability to form mixed disulfides and to exert radioprotection in animals<sup>16</sup>.

From these results it is concluded that the mechanisms of the 11  $\beta$ -hydroxylase inhibition exerted by metyrapone,

and by mixed disulfide-forming thiols and by di-thiols, differ from each other in various ways.

*Zusammenfassung.* Cysteamine hemmt die Steroid 11  $\beta$ -Hydroxylase schwächer als Metyrapone, jedoch stärker als Dithiole. Der Cysteamineffekt ist an die Konfiguration -SH-NH- gebunden, welche die Bildung gemischter Disulfide ermöglicht. Es werden Unterschiede im molekularen Mechanismus der Hemmwirkung zwischen den drei Stoffgruppen angenommen.

K. FLEMMING and VERA SEYDEWITZ<sup>17</sup>

*Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Universität, Abteilung Pharmakologie und Strahlenbiologie, Albertstrasse 23, D-7800 Freiburg (Federal Republic of Germany), 29 March 1974.*

<sup>12</sup> Z. M. BACQ, P. FISCHER and M. PIROTTE, *Archs int. Physiol.* 60, 535 (1952).

<sup>13</sup> P. FISCHER and M. GOUTIER-PIROTTE, *Archs int. Physiol.* 62, 76 (1954).

<sup>14</sup> A. PIHL, L. ELDJARN and J. BREMER, *J. biol. Chem.* 227, 339 (1957).

<sup>15</sup> L. ELDJARN and A. PIHL, in *Mechanisms in Radiobiology* (Eds. M. ERRERA and A. FORSSBERG, Academic Press, New York, 1960), vol. 2, p. 231.

<sup>16</sup> Z. M. BACQ, *Chemical Protection Against Ionizing Radiation* (Ed. I. NEWTON KUGELMASS; Charles C. Thomas, Springfield, Ill., USA 1965).

<sup>17</sup> This work was supported by a grant (No. St. Sch.257) of the Bundesminister für Forschung und Technologie, Bonn.

### Effet cumulatif de plusieurs anions sur une activité ATPasique $\text{Mg}^{2+}$ -dépendante, de la fraction microsomale des pléopodes de *Sphaeroma serratum* (Fabricius)

Le système d'osmorégulation de *Sphaeroma serratum* permet à ce crustacé isopode de maintenir sensiblement constante la composition ionique de son hémolymphe malgré les variations importantes de la salinité du milieu environnant.

Des études antérieures<sup>1</sup> ont montré que les membranes plasmiques des cellules constitutives du tissu épithélial des pléopodes séparant le milieu intérieur du milieu ambiant contenaient une forte activité ATPasique  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dépendante, avec deux affinités distinctes pour chacun de ces ions. Un modèle de régulation des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  a été ainsi proposé faisant intervenir 2 pompes à sodium chacune sous la dépendance d'une ATPase- $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ .

Le fait qu'il existe un transport actif d'anions dans des tissus épithéliaux comparables à celui des endopodites comme les branchies de poisson euryhalin<sup>2</sup> et une ATPase stimulée par les anions dans d'autres tissus épithéliaux également impliqués dans des processus de sécrétion ionique comme la muqueuse gastrique<sup>3</sup> ou pancréatique<sup>4</sup>, nous a incité à chercher si la régulation du contenu ionique de l'hémolymphe n'était pas également sous le contrôle d'une pompe à anion elle-même dépendante d'une ATPase spécifique. Les caractéristiques d'une telle enzyme sont présentées ici.

*Techniques.* Les pléopodes sont prélevés et homogénéisés dans un tampon histidine-imidazole  $5 \times 10^{-4} M$  à pH 7,4. Lorsque cela est nécessaire, l'homogénat est divisé

en ses différentes fractions subcellulaires par centrifugation différentielle qui sont caractérisées ultérieurement par le dosage d'enzymes spécifiques de ces fractions: ATPase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) pour les membranes plasmiques, cytochrome c oxydase pour les mitochondries (technique de LEIGHTON et al.<sup>5</sup>).

L'activité de l'ATPase -  $\text{Mg}^{2+}$  et de l'ATPase stimulée par les anions sont mesurées simultanément dans un milieu contenant 20 à 40  $\mu g$  protéine/ml, 2 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 2 mM ATP, 60 mM de tampon *tris* glycyl-glycine à pH 8,0,  $10^{-4}$  g ouabaine/ml 0.5 mM EDTA en présence ou non de 20 mM de l'anion considéré. Après 30 min à 35°C la réaction est stoppée par addition d'acide trichloracétique glacé à 10% et le phosphate inorganique libéré est dosé par une technique voisine de celle de FISKE et SUBBAROW<sup>6</sup>. L'activité de l'ATPase sensible aux anions

<sup>1</sup> J. PHILIPPOT, M. THUET et P. THUET, *Comp. Biochem. Physiol.* 41 B, 231 (1972).

<sup>2</sup> J. MAETZ, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 262, 209 (1971).

<sup>3</sup> D. K. KASBEKAR et R. P. DURBIN, *Biochim. biophys. Acta* 105, 472 (1965).

<sup>4</sup> B. SIMON et L. THOMAS, *Biochim. biophys. Acta* 288, 434 (1972).

<sup>5</sup> F. LEIGHTON, B. POOLE, H. BEAUFAY, P. BAUDHUIN, J. W. COFFEY, S. FOWLER et Ch. DE DUVE, *J. Cell Biol.* 37, 482 (1968).

<sup>6</sup> C. H. FISKE et Y. SUBBAROW, *J. biol. Chem.* 66, 375 (1925).

Stimulation par différents anions de l'activité ATPasique,  $Mg^{2+}$  dépendante, de la fraction microsomale des endopodites 4 et 5 de *Sphaeroma serratum*

Anion ajouté	Activité maximum de l'ATPase stimulée par les anions <sup>a</sup>		
	Activité due à l'addition d'un anion	Activité due à l'addition d'anion en présence de 20 mM de $HCO_3^-$ (4) <sup>b</sup>	Activité due à l'addition d'anion en présence de 20 mM de $Cl^-$ (4) <sup>b</sup>
Bicarbonate	100 (8) <sup>b</sup>	100	130
Maléate	89 (5)	172	90
Oxalate	83 (5)	124	79
Chlorure	31 (7)	130	31
Acétate	27 (5)	102	28
Arsenate	15 (2)	—	—

<sup>a</sup> Tous les résultats sont exprimés en pourcentage de la stimulation provoquée par le bicarbonate. <sup>b</sup> Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'expériences effectuées.

est obtenue en faisant la différence des activités mesurées en présence ou non de 20 mM d'anion.

**Résultats.** Le fractionnement de l'homogénat de pléopodes et l'utilisation d'enzymes marqueurs montrent que la fraction microsomale renferme 60% de l'activité de l'ATPase-anion, mesurée après fractionnement, 63% de l'ATPase ( $Na^+ - K^+$ ) et 10% de la cytochrome c oxydase contre respectivement 30, 29 et 70% à la fraction mitochondriale. Ce qui indique, qu'une ATPase sensible aux anions est certainement localisée dans les seules membranes plasmiques.

L'activité de l'ATPase- $Mg^{2+}$  et celle due à l'addition d'anion (ou ATPase-anion) présentent les propriétés suivantes lorsqu'on fait varier la concentration d'ATP, de  $Mg^{2+}$  ou de protéine membranaire. Quelle que soit la concentration de protéine, constante toutefois au cours de l'expérience, l'activité des 2 enzymes est maximum lorsque la concentration d'ATP et de  $Mg^{2+}$  sont égales. La stimulation est optimale lorsqu'on met en présence 2 mM ATP et 2 mM  $Mg^{2+}$ . En valeur spécifique ces deux activités ont une égale importance au maximum de stimulation, soit en moyenne 10  $\mu$ moles Pi/h/mg protéine. Il faut cependant signaler que ces activités maximales sont obtenues pour des pH légèrement différents ( $P < 0.001$ ) pH 8,0 pour l'ATPase- $Mg^{2+}$  et pH 7,6 pour l'ATPase stimulée par les anions présents à la concentration de 20 mM (bicarbonate ou maléate).

L'activité de l'enzyme étudiée en fonction de la concentration de l'anion passe par un maximum souvent très aigu pour 20 à 25 mM quelque soit l'anion considéré, bicarbonate, maléate, oxalate, chlorure, arsenate et acétate. Tous ces anions ne stimulent cependant pas pareillement l'enzyme comme le montre la 2ème colonne du Tableau où la stimulation maximum par les anions est exprimée en pour cent de l'activation par le bicarbonate. Le maléate et l'oxalate ont un effet très proche de celui du bicarbonate alors que le chlorure, l'acétate et l'arsenate ont peu d'effet sur l'activité de l'enzyme.

L'ion thiocyanate provoque une inhibition à 90% de l'ATPase stimulée par les anions et seulement à 45% de l'ATPase- $Mg^{2+}$ . Dans les deux cas l'inhibition maximum est obtenue pour une concentration de  $10^{-3}$  M de thiocyanate et le demi maximum d'inhibition pour  $7,5 \times 10^{-4}$  M qui est une constante se rapprochant de celle correspondant à l'inhibition de l'influx actif des ions chlorures au travers des branchies de poisson téléostéens<sup>7</sup> ( $1,5 \times 10^{-4}$  M) et à l'inhibition des ATPases ( $Na^+ - K^+$ ) de *Sphaeroma* par l'ouabaine ( $10^{-5}$  M)<sup>1</sup>.

Une propriété remarquable enfin de cette activité enzymatique est de présenter un phénomène d'additivité des différentes stimulations provoquées par les anions à condition que l'anion bicarbonate soit un des ions stimulateurs. Les 3ème et 4ème colonnes du Tableau montrent l'activité maximum obtenue avec chacun des anions en présence de 20 mM de  $HCO_3^-$  (3ème colonne) et de 20 mM de  $Cl^-$  (4ème colonne). Par comparaison avec la 2ème colonne, on constate que l'effet cumulatif n'apparaît qu'en présence de  $HCO_3^-$ . Ces résultats soulignent donc le rôle vraiment à part du bicarbonate, anion d'importance biologique, dans le processus de stimulation de l'enzyme et renforcent les termes de l'hypothèse de BLUM et al.<sup>8</sup> sur le mécanisme de cette stimulation. Pour ces auteurs en effet seule l'activation par le bicarbonate avait une signification biologique alors que les autres anions n'intervenaient qu'en fonction de leur pK pour modifier le site actif de l'enzyme et le rendre plus réactif à l'action du substrat, (catalyse nucléophile), comme le fait d'ailleurs le bicarbonate dans une étape préliminaire de l'activation de l'enzyme. Aussi peut on comprendre que le maléate active l'enzyme au même titre que le bicarbonate puisque leur pK sont voisins, respectivement 6.23 et 6.20 mais n'a pas son importance biologique puisqu'il ne peut présenter d'effet cumulatif.

Cet effet cumulatif semblerait donc montrer qu'au moins deux sites sont impliqués dans le processus d'activation de l'enzyme, ce qui serait en accord avec l'existence d'une ATPase dépendant de deux anions dont l'ion bicarbonate. L'existence d'une telle enzyme a été imaginée pour rendre compte de la sécrétion gastrique de  $HCl$ <sup>9</sup> de celle de  $HCO_3^-$  par le pancréas<sup>9</sup> ou des régulations anioniques chez les poissons euryhalins<sup>2</sup> qui tous supposent un échange actif entre  $HCO_3^-$  et  $Cl^-$  alimenté en énergie par une ATPase spécifique, mais aucune activation par deux anions n'avait pu être mise en évidence jusqu'à ce jour. Il n'en demeure pas moins vrai que dans l'état actuel de nos résultats il est impossible d'expliquer pourquoi l'effet cumulatif observé en présence de  $HCO_3^-$  varie d'un anion à l'autre et donc de coupler au bicarbonate un anion plutôt qu'un autre. L'effet du

<sup>7</sup> F. H. EPSTEIN, J. MAETZ et G. DE RENZI, Am. J. Physiol. 224, 1295 (1973).

<sup>8</sup> A. L. BLUM, G. SHAH, ST. PIERRE, H. F. HELANDER, C. P. LUNG, D. WIEBELHANS, et G. SACHS, Biochim. biophys. Acta 249, 101 1971.

<sup>9</sup> B. SIMON, R. KINNE et G. SACHS, Biochim. biophys. Acta 282, 293 (1972).

chlorure est apparemment la somme de l'effet produit par les anions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Cl}^-$  pris séparément (130) mais c'est un effet faible comparé à celui du maléate (172) pourtant non totalement cumulatif. Ces résultats montrent donc que le processus d'activation par deux anions est plus complexe qu'il n'apparaît et qu'il ne saurait être expliqué par un simple phénomène d'additivité des activations dues à chaque anion.

Une étape dans la compréhension de cette double activation sera de déterminer les corrélations existant entre les activités enzymatiques et les anions effectivement transportés. A ce jour, on a déjà montré un transfert net de  $\text{Cl}^-$  contre un gradient de concentration<sup>10</sup> chez *Sphaeroma* comme cela a été fait pour les branchies de poissons<sup>2</sup>.

**Conclusion.** La présence dans la fraction microsomale des endopodites 4 et 5 de *Sphaeroma serratum* d'une activité ATPasique sensible au bicarbonate et stimulée par l'addition d'un autre anion permet de supposer que cette enzyme pourrait être une ATPase stimulée par deux anions. L'existence d'une ATPase ( $\text{HCO}_3^-$ - $\text{Cl}^-$ ) ne peut être encore déduite de ces résultats mais ceux-ci constituent néanmoins un début de vérification de l'hypothèse émise pour rendre compte de la sécrétion chlorhydrique de l'estomac<sup>3</sup>, de la sécrétion pancréatique<sup>4</sup> ou de la régulation ionique chez les poissons euryhalins<sup>2</sup>. En effet, puisque ces différents phénomènes de transferts

postulent un échange actif  $\text{HCO}_3^-:\text{Cl}^-$  par un mécanisme similaire à celui du transport couplé de  $\text{Na}^+:\text{K}^+$ , il est normal de penser que la corrélation mise en évidence ci-dessus entre une activité ATPasique et 2 anions dont un serait le bicarbonate constitue une étape non négligeable dans la compréhension de ces mécanismes de transfert.

**Summary.** An  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase activity stimulated by the anions is found in the microsomal fraction prepared from a homogenate of the endopodites of pleopods 4 and 5 of *Sphaeroma serratum*. This enzyme has an optimal activity for 25 mM whatever the anion and for pH 7.6. Its inhibition is almost complete for  $10^{-3}$  M of thiocyanate. The stimulation of the enzyme by 2 anions is cumulative if  $\text{HCO}_3^-$  is one of these anions. This anion-stimulated ATPase could be involved with the ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ) ATPases in the osmoregulation mechanism of this isopod.

M. THUET et J. PHILIPPOT

Laboratoire de Physico-chimie biologique, Institut de Biologie, Boulevard Henri IV, F-34000 Montpellier (France), 9 Avril 1974.

<sup>10</sup> G. CHARMANTIER et P. THUET, C.R. Acad. Sci., Paris 269, 2405 (1969).

## Fatty Livers Induction by Orotic Acid Contained in Skim Milk Powder

Orotic acid, a normal intermediate of pyrimidine biosynthesis, was demonstrated to produce fatty livers and hepatic lesions in many animals<sup>1</sup>. Lipid accumulation in rats is periportal, more severe in females than in males and dependent on the diet<sup>2</sup>. 10 mg of orotic acid added to 100 g of feed altered liver metabolism in chicken<sup>3</sup>, and

orotic acid fed to lactating goats markedly decreased milk secretion<sup>4</sup>. Orotic acid is, however, a normal constituent of ruminant milk and found only in negligible amounts in human milk<sup>5</sup>. We have reported that dried milk powders contained relatively high amounts (100–180 mg) of orotic acid per 100 g<sup>6</sup>. We decided to investigate to what extent

Table I. The effect of experimental diets on food intake, rat weight and liver weight of rats on diets

Diet	Duration of feeding (days)	No. of rats	Food intake <sup>a</sup> per day (g)	Rat weight <sup>a</sup> (g)	Liver wt./100 g rat wt. <sup>a</sup> (g)
Control	3	5	12.82 ± 1.1	176.56 ± 7.2	3.34 ± 0.17
Control	8	5	11.68 ± 2.3	182.60 ± 8.3	3.38 ± 0.31
Group A <sup>b</sup>	3	5	11.20 ± 2.9	171.20 ± 4.5	3.45 ± 0.24
Group A <sup>b</sup>	8	5	9.94 ± 2.1	186.00 ± 12.8	3.53 ± 0.13
Group B <sup>c</sup>	3	5	9.33 ± 1.7	168.70 ± 4.2	3.72 ± 0.16
Group B <sup>c</sup>	8	5	8.75 ± 2.0	173.50 ± 5.1	3.89 ± 0.21

<sup>a</sup> Figures represent mean ± standard deviation. <sup>b</sup> Group A diet contained 0.15% orotic acid added to the balanced diet. <sup>c</sup> Group B diet consisted of an adequately supplemented powdered skim milk diet which was assayed to contain 0.15% orotic acid.

Table II. The total lipids and fat/protein ratio in livers from rats on experimental diets

	3 days feeding (g/100 g liverwt.) <sup>a</sup>		8 days feeding Fat/protein ratio
Control	3.49 ± 0.30	3.19 ± 0.24	0.16
Group A <sup>b</sup>	5.49 ± 1.0	7.10 ± 0.7	0.35
Group B <sup>c</sup>	6.55 ± 1.0	7.24 ± 2.2	0.36

<sup>a</sup> ± Standard Deviation. <sup>b</sup> Rats received control diet +0.15% orotic acid. <sup>c</sup> Rats received skim milk powder diet.

<sup>1</sup> S.B. STANDERFER and P. HANDLER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 270 (1955).

<sup>2</sup> H.E. SIDRANSKY, E. VERNEY and B. LOMBARDI, J. Nutr. 81, 348 (1960).

<sup>3</sup> M. MARCHETTI and P. PUDDU, Arch. Biochem. Biophys. 108, 468 (1964).

<sup>4</sup> J.E. KINSELLA, Comp. Biochem. Physiol. 28, 939 (1969).

<sup>5</sup> L.P. HALLANGER, J.B. LAASKO, and SCHULTZE, M.O. J. biol. Chem. 202, 83 (1953).

<sup>6</sup> P. OKONKWO and J.E. KINSELLA, Am. J. clin. Nutr. 22, 532 (1969).