

axolemma, which is in agreement with earlier data where we found splitting of axoplasmic phospholipids following exposure of intact squid giant axons to PhA_2 or PhC ^{1, 13, 14}. Lack of penetration may therefore not be the explanation for the finding¹⁵ that pancreatic PhA has no effect following external application, but blocks the action potential of the squid giant axon following internal perfusion. Unfortunately they only used externally one concentration of PhA , which was equal to the lowest concentration which had an effect internally.

PhA_2 , externally applied, causes vesiculation and disruption of the Schwann cell of the squid axon¹⁶ along with a large release of free amino acids¹ indicative of a breakdown of phospholipid-protein binding, correlating well with our present findings that PhA_2 is highly penetrable. The apparent penetration of PhA_2 was often above 100% which may indicate axoplasmic binding or assymmetric permeability properties. The high percent penetration of PhA_2 may not only be due to direct disruption of phospholipids but may be due to the concomitant production of lysophosphatides, which have a detergent action and are responsible for block of conduction following PhA_2 application to the squid giant axon¹⁷.

It is difficult to explain the apparent discrepancy between our finding that PhC does not block squid axon conduction following external application^{13, 17} even though we now know that it penetrates into the axoplasm, and the finding that internal injection (1.5 μl of a 0.5 mg/ml solution) or perfusion (5 mg/ml) of phospholipase C into the axoplasm causes a loss of excitability in 20 to 30 min¹⁸ (I. TASAKI, 1972, personal communication).

Summary. Following 1 h exposure, the level of phospholipase A_2 penetration into the axoplasm of the squid giant axon was 107 to 350% of that in the external media; corresponding values for phospholipase C were 18 to 31%. Phospholipases can therefore be used to study phospholipid function in axons since they can penetrate through connective tissue and Schwann cell to reach the axolemma.

P. ROSENBERG¹⁹

Section of Pharmacology and Toxicology, University of Connecticut, School of Pharmacy, Storrs (Connecticut 06268, USA), 23 May 1975.

¹³ P. ROSENBERG, *Toxicon* 8, 235 (1970).

¹⁴ E. CONDREA and P. ROSENBERG, *Biochim. biophys. Acta* 150, 271 (1968).

¹⁵ N. J. ABBOTT, T. DEGUCHI, D. T. FRAZIER, K. MURAYAMA, T. NARAHASHI, A. OTTOLENGHI and C. WANG, *J. Physiol., Lond.* 220, 73 (1972).

¹⁶ R. MARTIN and P. ROSENBERG, *J. Cell Biol.* 36, 341 (1968).

¹⁷ P. ROSENBERG and E. CONDREA, *Biochem. Pharmac.* 17, 2033 (1968).

¹⁸ I. TASAKI and T. TAKENAKA, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 52, 804 (1964).

¹⁹ I thank Dr. TOSHIO NARAHASHI for allowing me to use his laboratory facilities at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass. for the dissection of squid axons. Expert technical assistance in these studies were provided by Mr. STEVEN TRUDEL and Mr. STUART OWEN ROSENBERG. This work was supported in part by a grant from the University of Connecticut Research Foundation.

Evolution et contrôle de l'activité de l'argininosuccinate synthétase, de l'argininosuccinase et de l'arginase du foie foetal de rat

Control Activities and Regulation by the Glucocorticoids of Three Urea-Cycle Enzymes in Rat Foetal Liver: Argininosuccinate Synthetase, Argininosuccinase and Arginase

Au cours des derniers jours de la vie fœtale, de nombreuses enzymes s'accumulent dans le foie et il est souvent possible de déceler très tôt leur activité. De récentes recherches ont montré que la régulation de ces enzymes obéit, bien avant la naissance, à un déterminisme endocrinien. Ainsi, les travaux de JOST et JACQUOT¹⁻³, de GREENGARD⁴, de HOLT et OLIVER⁵, de RÄIHÄ et SUIHKONEN⁶, ont révélé le rôle important que jouent les glucocorticoïdes, le glucagon et d'autres hormones sur l'activité enzymatique de diverses voies métaboliques. Au cours d'une précédente note⁷, les activités des deux premières enzymes du cycle de l'urée, la carbamyl phosphatase synthétase, (E.C. 2, 7, 2, 2) et l'ornithine transcarbamylase (E.C. 2, 1, 3, 3) ont été mesurées chez le fœtus et leur contrôle par les glucocorticoïdes a été mis en évidence. Le présent travail rapporte les résultats obtenus en étudiant, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment⁷, trois autres enzymes impliquées dans la synthèse de l'urée, l'argininosuccinate synthétase (E.C. 6, 3, 4, 5), l'argininosuccinase (E.C. 4, 3, 2, 1) et l'arginase (E.C. 3, 5, 3, 1).

Matériels et méthodes. L'étude porte sur des rats blancs Sherman. L'âge du fœtus est déterminé par rapport au moment supposé de la fécondation (1 heure du matin). La surrénalectomie de la mère est faite à 14,5 jours. Les animaux opérés reçoivent à volonté de l'eau salée (NaCl 9 g l⁻¹). L'hypophysectomie des fœtus est faite dans les conditions habituelles, par décapitation in utero^{8, 9} à 18,5 jours. Certains fœtus décapités reçoivent

aussitôt après l'opération 0,1 mg d'acétate de cortisol (Roussel) par voie intrapéritonéale au travers du muscle utérin. D'autres fœtus entiers provenant de mères non surrénalectomisées reçoivent aussi cette préparation hormonale au même âge (18,5 jours) et des fœtus témoins de l'autre corne, un volume équivalent de NaCl à 9 g l⁻¹. Au stade de gestation à étudier, la mère est assommée et les fœtus sont retirés de l'utérus et saignés. Les foies sont rapidement prélevés et homogénéisés dans du bromure de N. cétyl-N, N, N, triméthylammonium à 0,1 % pour la mesure de l'activité de l'argininosuccinate synthétase et de l'argininosuccinase et dans un milieu constitué de 9 g l⁻¹ de NaCl et de 6 g l⁻¹ de MnSO_4 , 1 H_2O pour la mesure de l'activité de l'arginase. Les activités enzymatiques sont mesurées in vitro selon RATNER¹⁰ pour

¹ A. JOST et R. JACQUOT, *C. r. Acad. Sci., Paris* 239, 98 (1954).

² R. JACQUOT, *C. r. Soc. Biol., Paris* 150, 2137 (1956).

³ R. JACQUOT, *J. Physiol., Paris* 51, 655 (1959).

⁴ O. GREENGARD, M. K. SAHIB and W. E. KNOX, *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 2, 497 (1970).

⁵ P. G. HOLT and I. T. OLIVER, *Biochemistry* 8, 4 (1969).

⁶ N. C. R. RÄIHÄ and J. SUIHKONEN, *Biochem. J.* 107, 793 (1968).

⁷ C. GAUTIER, A. HUSSON et R. VAILLANT, *Experientia* 31, 125 (1975).

⁸ A. JOST, *C. r. Acad. Sci., Paris* 225, 322 (1947).

⁹ A. JOST, *Arch. Anat. Microsc. Morph. exp.* 40, 247 (1951).

¹⁰ S. RATNER, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN, Academic Press, New York 1955), vol. 2, p. 356.

Tableau I. Evolution de l'activité enzymatique (argininosuccinate synthétase, argininosuccinase et arginase) dans le foie fœtal

Age en jours	Argininosuccinate synthétase		Argininosuccinase		Arginase	
	μM Citrulline/h/g foie	μM Citrulline/mg protéines	μM Urée/h/g foie	μM Urée/mg protéines	μM Urée/h/g foie	μM Urée/mg protéines
17,5	8,9 $\pm$ 3,4 (7)	0,117 $\pm$ 0,044 (7)	7,7 $\pm$ 1,6 (8)	0,101 $\pm$ 0,022 (8)	1579 $\pm$ 318 (5)	20,7 $\pm$ 4,2 (5)
18,5	14,3 $\pm$ 4,5 (7)	0,171 $\pm$ 0,053 (7)	8,9 $\pm$ 1,8 (8)	0,106 $\pm$ 0,021 (8)	2611 $\pm$ 532 (6)	31,2 $\pm$ 6,3 (6)
19,5	14,6 $\pm$ 5,0 (12)	0,166 $\pm$ 0,056 (12)	10,1 $\pm$ 1,2 (11)	0,115 $\pm$ 0,014 (11)	4646 $\pm$ 605 (9)	54,1 $\pm$ 6,4 (9)
20,5	17,2 $\pm$ 3,1 (10)	0,222 $\pm$ 0,040 (10)	13,2 $\pm$ 2,3 (10)	0,162 $\pm$ 0,029 (10)	6032 $\pm$ 695 (10)	78,1 $\pm$ 9,0 (10)
21,5	23,4 $\pm$ 5,2 (11)	0,260 $\pm$ 0,051 (10)	13,7 $\pm$ 1,3 (14)	0,145 $\pm$ 0,014 (14)	8067 $\pm$ 1138 (16)	85,3 $\pm$ 12,0 (16)
Nouveau-né	39,0 $\pm$ 7,8 (9)	0,321 $\pm$ 0,056 (9)	54,0 $\pm$ 8,3 (6)	0,444 $\pm$ 0,092 (6)	24062 $\pm$ 3306 (7)	197,9 $\pm$ 27,2 (7)

Moyennes $\pm$ intervalle de confiance au niveau de probabilité: $p = 0,95$. () Nombre de mesures.

l'argininosuccinate synthétase et l'argininosuccinase et selon McLEAN et GURNEY¹¹ pour l'arginase. La citrulline et l'urée sont estimées selon la technique d'ARCHIBALD¹² modifiée par RATNER¹⁰. Les protéines sont dosées par la méthode de Biuret. Le test t de Fisher est utilisé pour l'analyse statistique¹³.

Résultats. Le tableau I rapporte les valeurs moyennes de l'activité de l'argininosuccinate synthétase, de l'argininosuccinase et de l'arginase, exprimée par gramme de foie et par mg de protéines, dans le foie fœtal, entre 17,5 et 21,5 jours, ainsi que dans les heures qui suivent la naissance. L'activité des trois enzymes décelable à 17,5 jours augmente régulièrement mais de façon moindre pour l'argininosuccinase durant la vie intrautérine et croît considérablement à la naissance, notamment pour l'argininosuccinase et l'arginase. L'activité de l'argininosuccinase est plus faible que celle de l'argininosuccinate synthétase au cours de la vie fœtale et plus élevée après la naissance. Le tableau II indique l'effet de la privation de corticostéroïdes naturels et de l'administration d'acétate de cortisol sur l'activité enzymatique. En l'absence de corticostéroïdes (surrénalectomie maternelle et décapitation in utero à 18,5 jours), seule l'activité de l'argininosuccinate synthétase est considérablement réduite et comparable à celle que l'on observe habituellement chez des fœtus de 18,5 jours (tableau I). L'opération subie par la mère n'affecte pas l'activité enzymatique chez les fœtus témoins. L'apport d'acétate de cortisol aux fœtus décapités restaure cette activité à un taux comparable à celui des témoins de la même portée. En ce qui concerne l'argininosuccinase, son activité n'est pas modifiée, soit par l'absence de corti-

costéroïdes soit par l'apport important de cortisol au moment de la décapitation. De même, l'activité de l'arginase n'est pas affectée par la décapitation, mais l'apport de cortisol aux fœtus décapités entraîne une augmentation de l'activité enzymatique. Une telle augmentation s'observe également lorsque le cortisol est administré au même âge à des fœtus entiers de mères normales.

Discussion. L'évolution de l'activité de ces enzymes a déjà été étudiée chez le fœtus de rat par plusieurs auteurs^{6,14,15}. Dans l'ensemble, nos résultats confirment et complètent leurs observations. Toutefois, l'étude comparative de l'activité de l'argininosuccinate synthétase et de l'argininosuccinase entre 21,5 jours et la naissance soulève un problème. Il semble qu'avant la naissance l'argininosuccinase soit l'enzyme limitante et qu'après ce soit l'argininosuccinate synthétase. Cette observation diffère des résultats rapportés par d'autres auteurs^{6,14} qui considèrent que seule l'argininosuccinate synthétase est l'enzyme limitante.

En fait l'argininosuccinate synthétase se comporte comme la carbamyl phosphate synthétase et l'ornithine transcarbamylase⁷. L'augmentation de son activité qui survient à partir de 19,5 jours dépend aussi de la

¹¹ McLEAN and M. GURNEY, *Biochem. J.* 87, 96 (1963).

¹² R. M. ARCHIBALD, *J. biol. Chem.* 156, 12 (1944).

¹³ R. M. ARCHIBALD, *J. biol. Chem.* 157, 507 (1945).

¹⁴ A. L. MILLER and P. CHU, *Enzym. Biol. clin.* 77, 497 (1970).

¹⁵ A. L. KENNAN and P. P. COHEN, *Dev. Biol.* 1, 511 (1959).

Tableau II. Effets du cortisol sur l'activité enzymatique (argininosuccinate synthétase, argininosuccinase et arginase) dans le foie fœtal à 21,5 jours

Traitement à 18,5 jours	Argininosuccinate synthétase		Argininosuccinase		Arginase	
	μM Citrulline/h/g foie	μM Citrulline/mg protéines	μM Urée/h/g foie	μM Urée/mg protéines	μM Urée/h/g foie	μM Urée/mg protéines
Témoins	26,6 $\pm$ 4,6 (14)	0,330 $\pm$ 0,057 (14)	15,8 $\pm$ 2,9 (13)	0,193 $\pm$ 0,035 (13)	7578 $\pm$ 839 (17)	92,9 $\pm$ 10,3 (17)
Décapités	14,0 $\pm$ 4,7 (6) ^c	0,158 $\pm$ 0,053 (6) ^c	16,0 $\pm$ 8,2 (7)	0,180 $\pm$ 0,090 (7)	7682 $\pm$ 1274 (8)	86,6 $\pm$ 14,6 (6)
Décapité ^a + cortisol	29,3 $\pm$ 9,2 (8) ^c	0,397 $\pm$ 0,125 (8) ^c	19,8 $\pm$ 5,0 (6)	0,269 $\pm$ 0,067 (6)	11788 $\pm$ 2296 (9) ^c	146,0 $\pm$ 31,4 (9) ^c
Témoins ^b + NaCl 9 g l ⁻¹					7874 $\pm$ 1415 (10)	113,3 $\pm$ 18,8 (10)
Témoins ^b + cortisol					10744 $\pm$ 1361 (10) ^c	148,9 $\pm$ 22,4 (10)

Moyennes $\pm$ intervalle de confiance au niveau de probabilité: $p = 0,95$. ^a Les fœtus issus de mères surrénalectomisées à 14,5 jours sont décapités et injectés de cortisol à 18,5 jours. ^b Certains fœtus entiers issus de mères normales sont injectés de cortisol à 18,5 jours et d'autres de la même portée sont injectés de NaCl 9 g l⁻¹. ^c Différence significative pour $p = 0,05$. () Nombre de mesures.

présence des glucocorticostéroïdes. Cet effet a été également observé par SCHWARTZ¹⁶, mais dans des conditions expérimentales différentes, en mesurant l'activité, du système arginine synthétase et dans le foie foetal cultivé in vitro. Cet auteur n'observe aucun effet in vivo après un apport supplémentaire de corticostéroïdes exogènes. Cette observation n'est guère surprenante compte tenu que la quantité de corticostérone endogène normalement présente au cours de cette période est déjà importante¹⁷.

Au contraire ces hormones ne semblent pas indispensables à l'augmentation d'activité de l'argininosuccinase et de l'arginase. Leur rôle ne semble être déterminant qu'après la naissance¹⁸ et à l'âge adulte^{11,19}. En ce qui concerne l'arginase, les résultats sont plus surprenants. En effet, bien que l'activité de cette enzyme ne soit pas modifiée par l'absence de corticostéroïdes à partir de 18,5 jours, celle-ci est toutefois augmentée par l'administration au même âge de cortisol exogène. Ces observations impliquent de s'assurer d'une part que la date de mise au repos des surrénales fœtales (18,5 jours) n'est pas trop tardive en mesurant l'activité de cette enzyme chez des fœtus décapités plus tôt (17,5 jours) et d'autre part que la maturité fonctionnelle du foie foetal pour cette enzyme peut être avancée.

Summary. The activity of three urea-cycle enzymes, argininosuccinate synthetase, argininosuccinase and arginase have been studied in the foetal and new-born liver of rats. The activity increases with regularity between 17.5 days of pregnancy and birth in control foetuses. The lack of corticosteroid from 18.5 days of pregnancy decreases the activity of argininosuccinate synthetase. After administration of cortisol (hydrocortisone), to these 18.5-day-old foetuses lacking of corticosteroids, both activities of argininosuccinate synthetase and arginase are enhanced.

A. HUSSON, C. GAUTIER et
R. VAILLANT²⁰

Université de Rouen, Laboratoire d'Endocrinologie
U.E.R. des Sciences et des Techniques, Boîte postale 67,
F-76130 Mont-Saint-Aignan (France), 5 Mai 1975.

¹⁶ A. L. SCHWARTZ, Biochem. J. 126, 89 (1972).

¹⁷ J. P. DUPOUY, C. r. Acad. Sci., Paris, sous presse.

¹⁸ H. ILLNEROVA, Physiologia bohemoslov. 15, 23 (1966).

¹⁹ R. A. FREEDLAND and C. H. SODIKOFF, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 394 (1962).

²⁰ Ce travail a été réalisé avec l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat N° 7371148).

Sorbitol Dehydrogenase in *Anas platyrhynchos* and *Zenaida auriculata auriculata* During Development

The sorbitol dehydrogenase (E.C.: 1.1.1.14) converts sorbitol to fructose according to the following reaction: Sorbitol + NAD⁺ $\xrightarrow{E}$ Fructose + NADH + H⁺. BREUSCH¹ was the first who demonstrated the SDH activity in vitro in the cat liver slides. Later, several authors²⁻²⁰ studied the enzyme in various tissues of different species and found that it appears in the early stages during the development of chick embryo, varying its activity along the periods studied.

The large distribution of this enzyme, its presence in the germinal epithelium of the individual whose phylogenetic origin is very primitive^{10,11}, the fact that it appears early during the development, the poor knowledge about its activity, its molecular structure and its physiological role prompted the present study on SDH in several bird species of South American faunas during their development.

Materials and methods. Tissues: Eggs of *Zenaida auriculata auriculata* (golden pidgeon) from Piquillín and Villa Ascasubi (Córdoba, Argentina) and of the *Anas platyrhynchos* ('creole' domestic duck) from local farm

were incubated at 37 ± 5°C during 12 and 28 days, respectively. The young golden pidgeons were maintained up to 60 days in captivity; the adult *Zenaida auriculata auriculata* were caught in Córdoba fields and placed in bird-cages. The domestic duck grew in captivity. The animals were sacrificed by decapitation and the tissues (liver, kidney, testes and ovary) were removed and immediately placed in chilled beakers; all the operations were performed at 4°C.

Tissue homogenates were made in 3 or 4 volumes of ice cold 0.15 M NaCl containing 0.003 M NaHCO₃ using a TenBroeck glass homogenizer. The supernatant obtained by centrifuging the homogenate at 27,000 g for 30 min in

¹ F. L. BREUSCH, Enzymologia 10, 165 (1943).

² R. L. BLAKLEY, Biochem. J. 49, 257 (1951).

³ H. G. WILLIAM-ASHAM and J. BANKS, Arch. Biochem. 50, 513 (1954).

⁴ H. G. HERS, Biochim. biophys. Acta 22, 202 (1956).

⁵ H. G. HERS, Le métabolisme du Fructose (Arscia, Bruxelles 1957).

⁶ H. G. HERS, Biochim. biophys. Acta 37, 127 (1960).

⁷ T. E. KING and T. MAN, Nature, Lond. 182, 868 (1958).

⁸ H. G. WILLIAM-ASHAM, personal communication.

⁹ D. W. BISHOP, Annual Report of the Carnegie Institute (1965), p. 495.

¹⁰ D. W. BISHOP, J. gen. Physiol. 50, 2504 (1967).

¹¹ D. W. BISHOP, in *Reproduction and Sexual Behavior* (Ed. M. DIAMONS, Indiana University Press, Bloomington 1968), p. 261.

¹² A. B. JOHNSON, J. Histochem. Cytochem. 13, 583 (1965).

¹³ A. B. JOHNSON, J. Histochem. Cytochem. 15, 207 (1967).

¹⁴ R. K. MURRAY, J. GADACZ, M. BACH, S. HARDIN and H. P. MORRIS, Can. J. Biochem. 47, 587 (1968).

¹⁵ A. W. ANDERSON and P. PERSONNE, J. Microsc. 8, 97 (1969).

¹⁶ F. HEINZ and W. FRIEDHEIM, Comp. Biochem. Physiol. 37, 283 (1969).

¹⁷ K. H. GABBAY and J. B. O'SULLIVAN, Diabetes 17, 239 (1968).

¹⁸ A. RIVA and E. USAT, Fertil. Steril. 27, 341 (1970).

¹⁹ F. MICUCCI, M. A. RAMA, N. CASTELLANO and N. I. GERMINO, J. Anat. 109, 209 (1971).

²⁰ S. P. FABRO, D. W. BISHOP and A. L. GOLDBERG, submitted for publication (1975).

Table I. SDH specific activity during the development of *Zenaida auriculata auriculata*

Tissue	Embryo	Stage	
		Young	Adult
Liver	2.15 ± 0.04 (4)	4.75 ± 0.02 (6)	10.70 ± 0.15 (6)
Kidney	3.00 ± 0.06 (4)	5.70 ± 0.68 (6)	10.20 ± 0.26 (6)
Testes	0.51 ± 0.05 (4)	1.63 ± 0.14 (6)	3.75 ± 0.19 (6)
Ovary	0.40 ± 0.08 (4)	0.99 ± 0.04 (6)	1.29 ± 0.02 (6)

Specific activity in 10⁻³ nmoles NADH formed per min per mg protein ± SEM. Figures in brackets indicate number of determinations.