

LOCALISATION MITOCHONDRIALE D'ENZYMES LIEES AU METABOLISME DU GLYCOGENE DANS LE SPERMATOZOIDE DE L'ESCARGOT

PAUL PERSONNE and WINSTON ANDERSON

From the Laboratoire de Biologie Animale, Faculté des Sciences, Amiens, France, et Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Faculté des Sciences, Orsay, France. Dr. Anderson's present address is Laboratories of Human Reproduction and Reproductive Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

ABSTRACT

The mitochondrial derivative of the sperm cell of the Gastropod *Helix* is endowed with a compartment loaded with glycogen (Personne et André, 1964). The aim of this work is to establish whether this mitochondrial glycogen is synthesized in the mitochondrial derivative itself or elsewhere in the cell. For this purpose, living sperm were first incubated in a medium containing glucose 1-phosphate, then fixed, sectioned, and stained specifically for polysaccharides by the phosphotungstic acid technique or the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate technique. Comparison with controls shows that a synthesis of glycogen occurred during the time of incubation. It can be inferred from this result that an amylophosphorylase system controlling the metabolism of polysaccharides is present in the mitochondrial derivative itself. Results obtained with the iodine technique indicate that the original glycogen molecules are elongated during the experiment. It seems probable that the amylophosphorylase system demonstrated here accounts for at least a part of the proteinaceous coat morphologically detectable around each individual glycogen particle.

La présence de glycogène à l'intérieur de mitochondries a été montrée pour la première fois par Beaulaton (1964) dans la glande prothoracique du ver à soie du chêne. D'autres exemples de présence de grains morphologiquement identiques aux particules de glycogène décrites par Drochmans (1962) ont été signalés dans les mitochondries de plusieurs autres tissus (Tandler et Shipkey, 1964; Ishikawa et Pei, 1965; Lin, 1965; Berthold, 1966; Fain-Maurel, 1966; Lentz, 1966) et dans le dérivé mitochondrial du spermatozoïde de divers Gastéropodes, Testacelle (Personne et André, 1964), Escargot (André, 1965), Limace (Lanza et Quattrini, 1964), Limnée (Personne, non publié) et de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Anderson, 1968). Dans le cas de la Testacelle et de l'oursin, nous avons fait la preuve cytochi-

mique qu'il s'agit bien de glycogène (Personne et André, 1964; Anderson, 1968).

L'existence de glycogène dans certaines mitochondries nous a conduit (Personne et André, 1964; André, 1965; Anderson, 1968) ainsi qu'Ishikawa et Pei (1965), Lentz (1966), et Fain-Maurel (1966) à envisager l'intervention de ces mitochondries dans le métabolisme glucidique. Cette hypothèse suppose la présence, dans ces mitochondries, des enzymes de la dégradation et de la synthèse du glycogène. Pour la vérifier, faisant la supposition initiale que les voies métaboliques de l'Escargot sont identiques dans leurs grandes lignes à celles des Mammifères, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence éventuelle de certaines des activités enzymatiques connues pour régir le métabolisme du glycogène dans les

muscles et le foie des Mammifères: l'uridine diphospho-glucose glycogène transférase (2.4.1.11 = UDPglucose: α -1,4-glucan α -4-glucosyltransférase), les phosphorylases (Green et Cori, 1943; Sutherland et Wosilait, 1956) (2.4.1.1 = α -1,4-glucan: orthophosphate glucosyltransférase) et l'enzyme branchante (2.4.1.18 = α -1,4-glucan: α -1,4-glucan 6-glycosyltransférase).

Ces recherches ont été faites chez l'Escargot. Le dérivé mitochondrial du spermatozoïde est, dans ce cas, de taille suffisante pour que les différents constituants soient visibles au microscope ordinaire. Il constitue, en fait, la plus volumineuse concentration de glycogène mitochondrial connue.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

L'espèce *Helix aspersa* Müller a été utilisée.

Microscopie Ordinaire

Les activités enzymatiques ont été recherchées sur des coupes au cryostat d'ovotestis congelé dans l'azote liquide, ou sur des frottis séchés à l'air de spermatozoïdes mûrs.

Du point de vue cytochimique, nous employons le principe de la technique de Takeuchi et Kuriaki (1955): après incubation des tissus dans un substrat approprié, le polysaccharide néoformé est mis en évidence par sa coloration à l'icde. La coloration varie du rouge au bleu selon la longueur de la chaîne glycogénique (Swanson, 1948).

PHOSPHORYLASE ET ENZYME BRANCHANTE: Les tissus sont mis à incuber pendant 1 à 2 heures à 37° dans les milieux décrits ci-dessous. Les solutions témoin sont dépourvues de glucose 1-phosphate (G_1P):

(a) Pour la phosphorylase *a* active: G_1P potassique, 25 mg; tampon acétate 0.2 M pH 6, 5 ml; eau distillée, 7.5 ml.

(b) Pour la phosphorylase totale *a* + *b* activée par AMP. On ajoute 5 mg AMP au milieu précédent. C'est la méthode de Takeuchi et Kuriaki (1955).

(c) Pour la phosphorylase totale par transformation de la forme *b* inactive. On ajoute de l'ATP (5 mg) et du $MgSO_4$ (4 mg) pour activer la phosphorylase kinase et du NaF (10 mg) pour inhiber la phosphorylase phosphatase (Guha & Wegmann, 1959).

(d) Milieu *c* auquel on a ajouté 13 mg de nitrate ou d'acétate de plomb.

(e) Milieu de Hori (1964; voir techniques de microscopie électronique).

(f) Enzyme branchante. De façon à distinguer l'action de la phosphorylase seule de celle de son action combinée avec l'enzyme branchante, nous avons utilisé la méthode de Takeuchi (1958). L'adjonction de 20% d'éthanol aux milieux précédents inhibe l'enzyme branchante. Le traitement par les amylases α et β (solution à 0.5%) permet de distinguer les chaînes amylo-siques simples synthétisées par la phosphorylase, des chaînes ramifiées par action de l'enzyme branchante.

UDPG GLYCOGÈNE TRANSFÉRASE: Les tissus sont mis à incuber à 20° pendant 30 minutes à 3 heures dans le milieu de Hsien-Gien Sie et al. (1966): UDPG, 200 mg; glycogène, 10 mg; G_6P disodique, 450 mg; polyvinylpyrrolidone, 1000 mg; ethanol, 1 ml; glycine (0.75 M)-EDTA (0.025 M), 10 ml; eau distillée, 14 ml.

En ajoutant 50 mg de fluorure de sodium au milieu précédent les incubations sont faites à 37°.

L'UDPG est omis dans le témoin.

Microscopie Électronique

Nous avons cherché à visualiser l'activité phosphorylasique au niveau ultrastructural. Les processus opératoires sont les suivants:

INCUBATION: Les spermatozoïdes mûrs, prélevés dans le canal hermaphrodite (Personne et Anderson, 1969) sont mis à incuber de 30 minutes à 3 heures à 37° dans les milieux suivants:

(a) milieu de Hori (1964) au plomb. Il dérive de celui de Gomori pour la phosphatase acide; le plomb présent dans le milieu permet de précipiter le phosphate libéré lors de la réaction phosphorylasique. Il est constitué de: 1.5 mM de G_1P potassique, 20 mM de NaF, 80 mM de tampon acétate pH 5.8, 3.6 mM de nitrate de plomb. Dans certains cas, nous avons ajouté 0.14 mM d'AMP ou d'ATP. Nous avons aussi remplacé le nitrate de plomb par de l'acétate de plomb considéré comme moins toxique (Lake, 1966).

Le G_1P est omis dans les milieux témoin.

(b) milieu de Guha et Wegmann (1959) pour la phosphorylase totale, comme indiqué précédemment.

FIXATION ET INCLUSION: Après incubation, les spermatozoïdes sont lavés rapidement dans le tampon, puis fixés 1 heure par l'acide

osmique à 2% dans un tampon phosphate 0.1 M de pH 7.4, déshydratés par l'acétone, puis inclus dans l'Epon (Luft, 1961).

TRAITEMENT DES COUPES: (a) Après incubation dans le milieu de Hori les coupes sont examinées sans autre traitement. (b) Après incubation dans le milieu de Guha et Wegmann, les coupes sont traitées pour mettre en évidence les polysaccharides par l'acide phosphotungstique à 0.5% pendant 2 à 5 minutes (Marinozzi, 1967) ou par la technique à l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967). Certaines coupes ont subi la double coloration par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique pendant 5 minutes et par le citrate de plomb (Venable et Coggeshall, 1965) pendant 5 minutes.

OBSERVATIONS

Phosphorylases

MICROSCOPIE ORDINAIRE: Après incubation dans le milieu de Takeuchi, l'inclusion de glycogène de la pièce intermédiaire se colore en bleu violacé ou violet (Pl. I, fig. 2). Cette coloration n'apparaît pas sur les témoins incubés sans G₁P (Pl. I, fig. 1). En l'absence d'activateur, AMP ou ATP + Mg⁺⁺, seuls certains spermatozoïdes se colorent. Lorsque l'on ajoute l'activateur, on observe une coloration dans tous les spermatozoïdes mûrs, mais jamais dans les spermatozoïdes jeunes ni dans les spermatides. Lorsque l'incubation a été faite en l'absence d'éthanol, le traitement par la β amylase ne modifie pas la colorabilité à l'iode. Dans le cas contraire le traitement

par la β amylase fait disparaître la colorabilité à l'iode.

Aucune structure n'est colorable par l'iode dans les spermatozoïdes incubés dans le milieu de Hori au nitrate de plomb. Il en est de même lorsqu'on ajoute du nitrate ou de l'acétate de plomb au milieu de Guha et Wegmann ou à celui de Takeuchi et Kuriaki.

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE: Après incubation dans le milieu de Guha et Wegmann, l'hélice principale est fortement contrastée par l'acide phosphotungstique utilisé selon la méthode de Marinozzi (1967). Il est très difficile d'y déceler une structure bien définie (Pl. II, fig. 6; Pl. III, fig. 9). Sur les spermatozoïdes incubés en l'absence de glucose 1-phosphate, l'acide phosphotungstique ne donne pas la même "coloration". L'aire glycogénique est beaucoup plus faiblement contrastée. Son contenu apparaît sous la forme de particules β comme sur une image morphologique normale. (Pl. II, fig. 5).

Le traitement par l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent selon Thiéry contraste fortement le contenu de l'hélice principale. Sur les spermatozoïdes incubés en l'absence de glucose 1-phosphate, le glycogène se présente sous la forme monoparticulaire (Pl. II, fig. 7). Après incubation dans le milieu au glucose 1-phosphate, les particules β ne sont pas visibles, l'hélice principale est uniformément colorée (Pl. II, fig. 8; Pl. III, fig. 11).

L'aspect différent de l'aire de glycogène peut

PLANCHE I.

FIGURES 1 et 2 Microscopie ordinaire, coloration à l'iode.

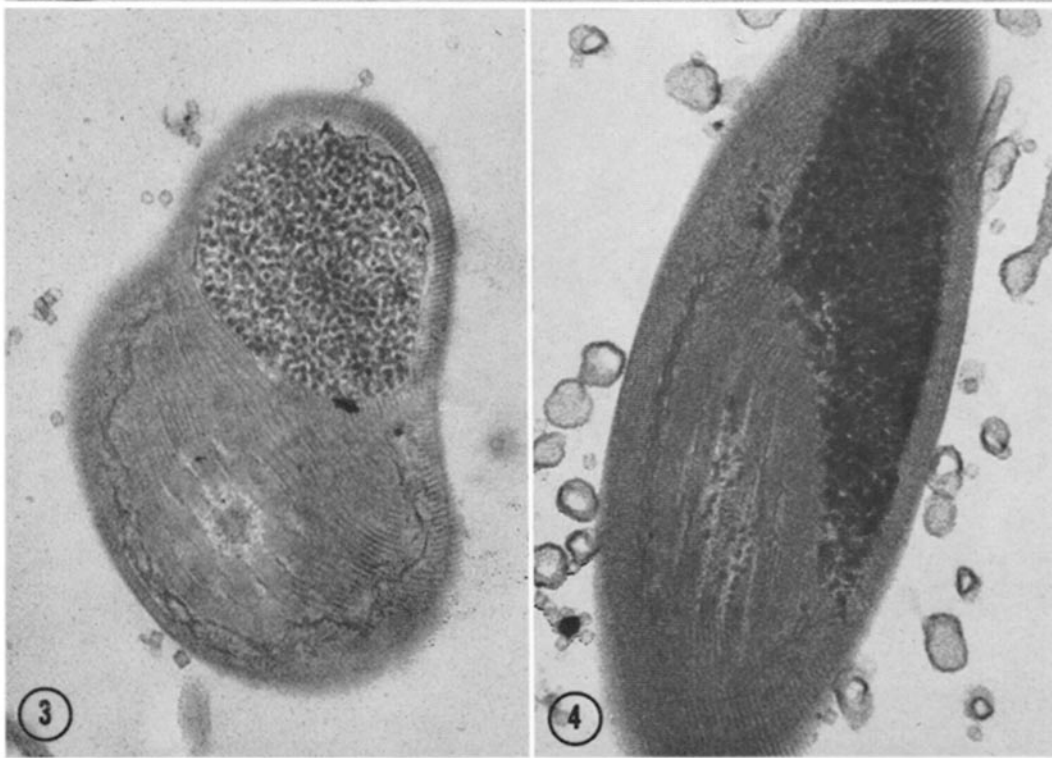
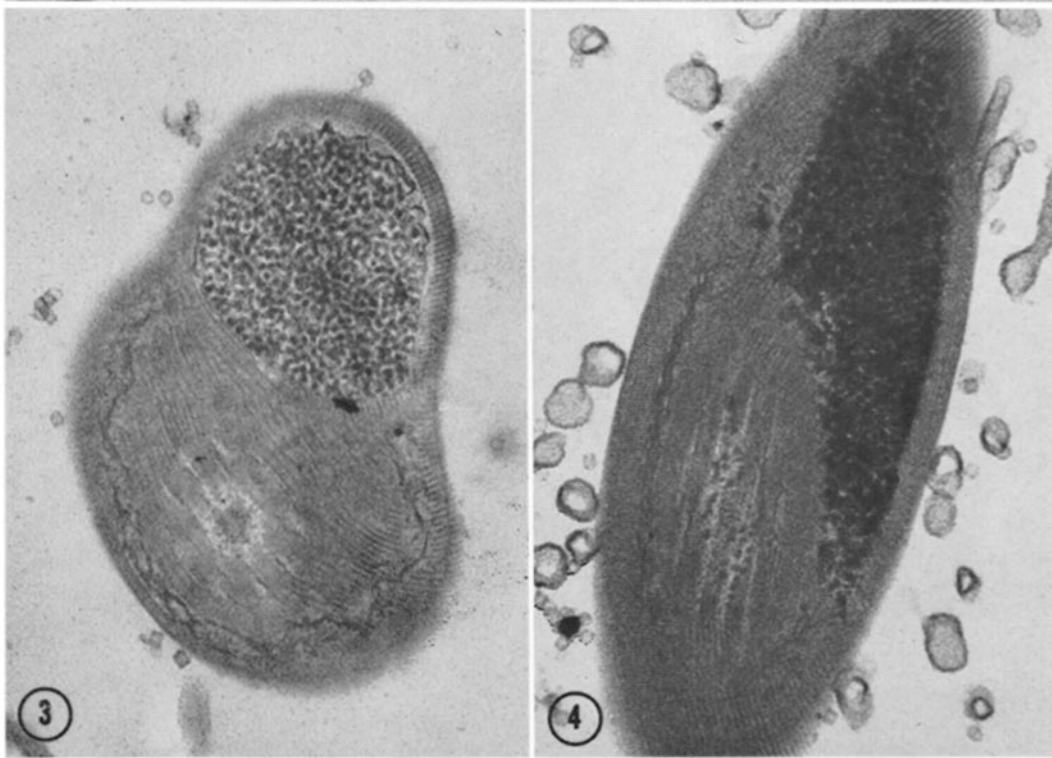
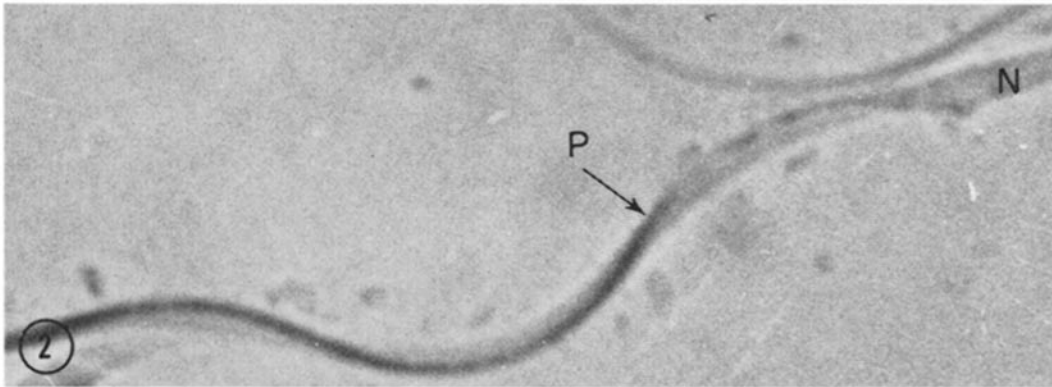
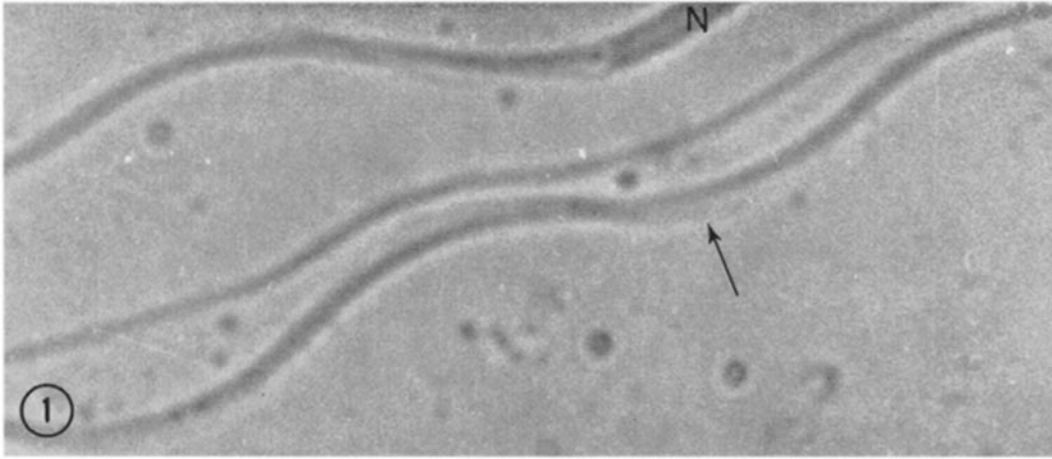
FIGURE 1 Spermatozoïde incubé dans le milieu témoin dépourvu de glucose 1-phosphate (G₁P), puis coloré à l'iode. L'hélice principale (flèche) n'est pas colorée. N: noyau. \times 5000

FIGURE 2 Spermatozoïde incubé dans le milieu au G₁P, puis coloré à l'iode. On reconnaît le noyau N et l'immense pièce intermédiaire dans laquelle on voit une hélice fortement colorée par l'iode; cette hélice est l'hélice principale (P), où se localise le glycogène. \times 5000.

FIGURES 3 et 4 Microscopie électronique (coloration acétate d'uranyle-plomb).

FIGURE 3 Coupe transversale de spermatozoïde incubé dans le milieu témoin sans G₁P. Les particules β de glycogène sont bien visibles. \times 60,000.

FIGURE 4 Coupe oblique de spermatozoïde incubé dans le milieu au G₁P. L'inclusion de glycogène est beaucoup plus fortement colorée. Les particules β sont jointives et mal délimitées. \times 60,000.



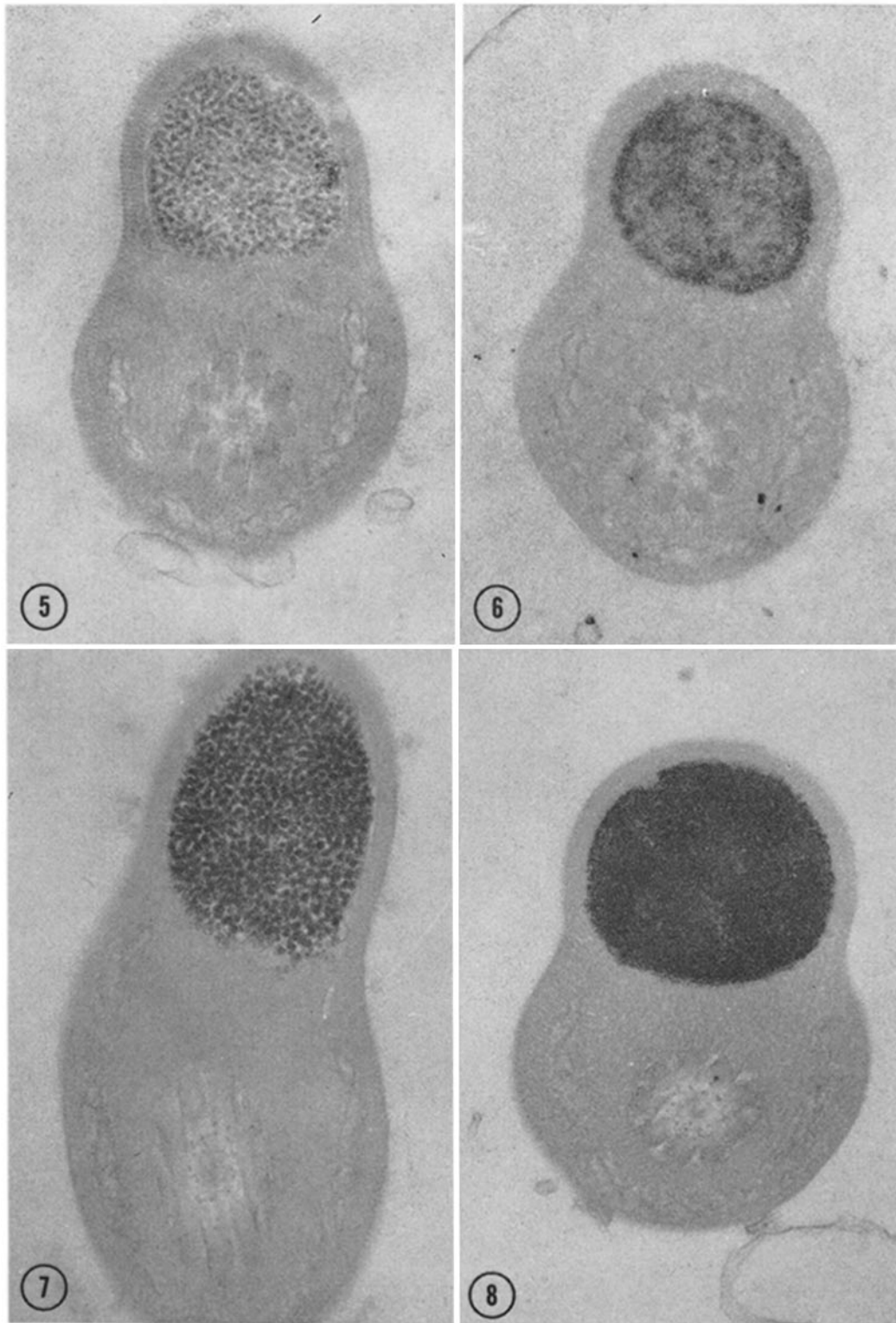


PLANCHE II.

Coupes transversales de la région antérieure de la pièce intermédiaire.

FIGURE 5 Après incubation dans le milieu témoin sans G_1P , les particules β de glycogène sont bien visibles. Coloration par l'acide phosphotungstique. $\times 60,000$.

FIGURE 6 Après incubation dans le milieu au G_1P , l'inclusion de glycogène est entièrement colorée. Les particules β ne sont plus visibles. Coloration par l'acide phosphotungstique. $\times 60,000$.

FIGURE 7 Après incubation dans le milieu témoin sans G_1P , les particules β sont bien visibles. Coloration par l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent. $\times 60,000$.

FIGURE 8 Après incubation dans le milieu au G_1P , les particules β ne sont pas visibles. Coloration par l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent. $\times 60,000$.

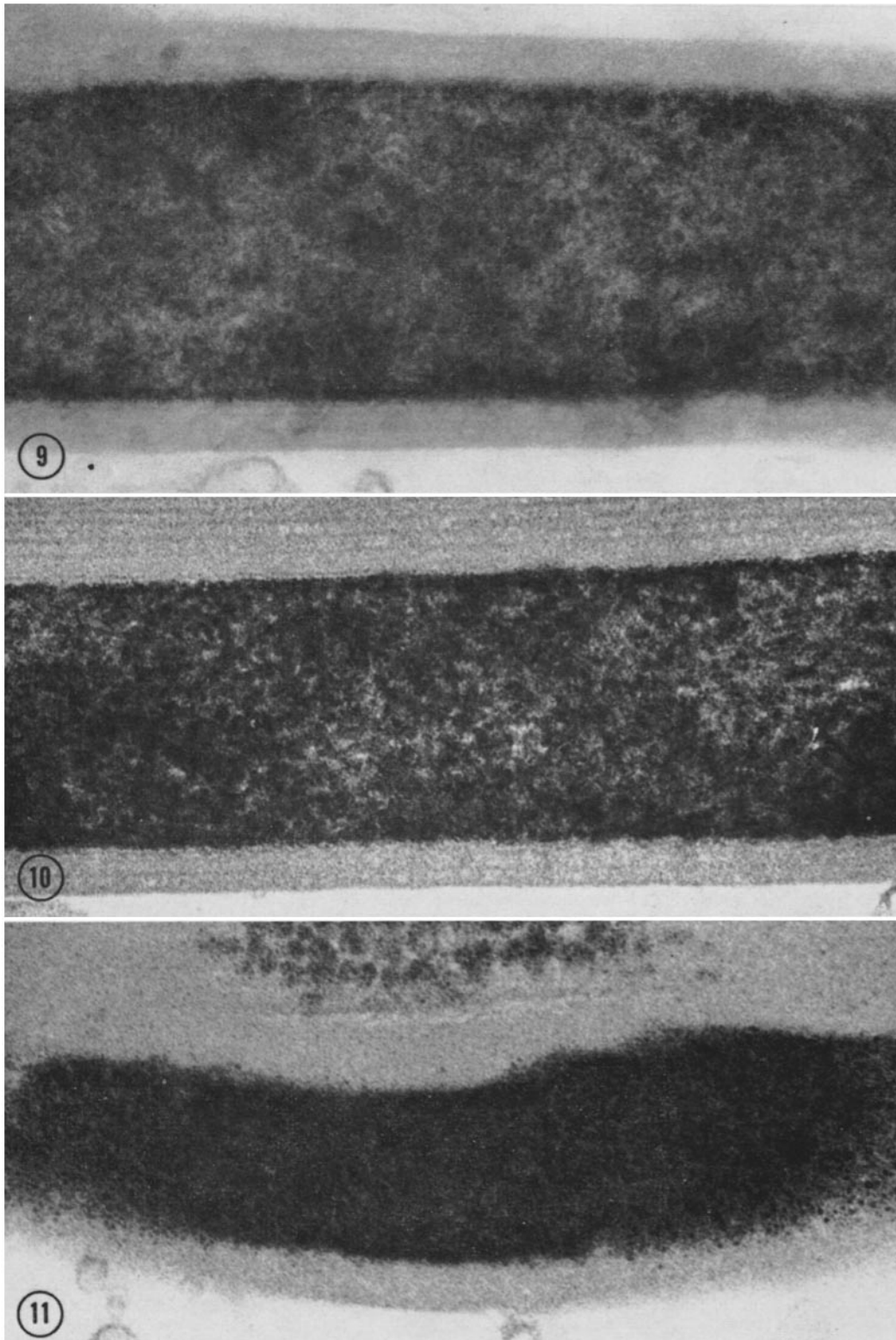


PLANCHE III.

Coupes longitudinales de la pièce intermédiaire de spermatozoïdes incubés dans le milieu au G₁P.

FIGURE 9 Coloration par l'acide phosphotungstique. $\times 120,000$.

FIGURE 10 Coloration par l'acétate d'uranyle, citrate de plomb. $\times 120,000$.

FIGURE 11 Coloration par l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent. $\times 120,000$

également être visualisé, mais de façon moins nette après coloration par le citrate de plomb. Sur les spermatozoïdes incubés en présence de G_1P , l'hélice principale est très noire. Les particules sont assez mal délimitées (Pl. I, fig. 4; Pl. III, fig. 10). L'hélice principale des spermatozoïdes incubés en l'absence de G_1P est plus faiblement colorée, et les particules sont bien délimitées (Pl. I, fig. 3). Après incubation dans le milieu de Hori, nous n'avons pas décelé de précipités de phosphate de plomb. Dans ces spermatozoïdes, après traitement par l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent, l'aire de glycogène se présente sous la forme monoparticulaire comme dans les spermatozoïdes témoin.

UDPG Glycogène Transférase

En l'absence comme en présence de glucose-6-phosphate, quel que soit le degré de maturité des spermatozoïdes, aucun polysaccharide n'est décelable par l'iode après incubation dans le milieu de Hsien-Gien Sie (1966) contenant de l'UDPG.

DISCUSSION

En présence de glucose 1-phosphate, dans les conditions cytochimiques que nous utilisons, le dérivé mitochondrial du spermatozoïde de l'Escargot synthétise des chaînes glucosidiques. Ce sont elles que nous révélons par l'iode dans la technique de Takeuchi et Kuriaki. L'enzyme qui permet cette synthèse est une α -glucan phosphorylase (2.4.1.1. = α -1,4-glucan:orthophosphate glucosyltransférase). Le glycogène présent agit comme "primer" et subit un allongement de ses chaînes qui le rend colorable par l'iode.

Nous n'avons pas réussi à visualiser au microscope électronique, par la technique de Hori, le phosphate libéré au cours de cette synthèse. Les spermatozoïdes incubés dans le milieu de Hori ne présentent d'autre part aucune coloration par l'iode de l'inclusion glycogénique. Nous avons obtenu le même résultat en ajoutant du nitrate de plomb ou de l'acétate de plomb au milieu de Guha et Wegmann. Ces observations nous suggèrent une inactivation de l'enzyme par les sels de plomb.

Dans l'impossibilité de visualiser le phosphate libéré, nous avons cherché à mettre en évidence la néoformation du glycogène. L'acide phosphotungstique utilisé dans les conditions indiquées par Marinozzi (1967) et le protéinate d'argent

après action de l'acide périodique et de la thiosemicarbazide (Thiéry, 1967) se sont révélés d'un emploi très commode. La différence d'intensité de coloration entre les spermatozoïdes incubés dans le milieu complet et les témoins est très significative. Sans mettre en évidence le glycogène néoformé comme la technique à l'iode, les techniques de Marinozzi et de Thiéry permettent de démontrer un accroissement du stock préexistant de glycogène par l'amylophosphorylase.

La majeure partie de cette phosphorylase se trouve sous sa forme inactive. C'est elle que l'on décèle après incubation dans le milieu de Guha et Wegmann, en provoquant sa transformation en forme active sous l'influence de la phosphorylase kinase (2.7.1.38 = ATP: phosphorylase phosphotransférase) en présence d'ATP et de Mg^{++} (Fischer et Krebs, 1955; Krebs et Fischer, 1956; Krebs et al., 1955, 1958; Rall et al., 1956). La présence de NaF dans le milieu inhibe en même temps la phosphorylase phosphatase (3.1.3.17. = phosphorylase phosphohydrolase) (Cori et Cori, 1945; Krebs et Fischer, 1956; Wosilait et Sutherland, 1956). L'AMP est susceptible, comme dans le cas du muscle, d'activer cette phosphorylase inactive. C'est cette activation qui se produit au cours de l'incubation dans le milieu de Takeuchi et Kuriaki. La forme active, la seule qui agit en l'absence d'AMP ou d'ATP + Mg^{++} , ne se rencontre que dans certains spermatozoïdes.

Le glycogène synthétisé au cours de ces réactions doit posséder une structure ramifiée puisqu'il n'est pas attaqué par la β amylase. Il résulte donc d'une action combinée de la phosphorylase et de l'enzyme branchante (2.4.1.18 = α -1,4-glucan: α -1,4-glucan 6-glycosyltransférase) responsable des liaisons 1-6. En présence d'éthanol dans le substrat, il y a inhibition de l'enzyme branchante. Dans ce cas, il n'y a synthèse par la phosphorylase que de chaînes non ramifiées. Celles-ci sont digérées par l' α et la β amylases.

Ainsi, nos résultats démontrent que le dérivé mitochondrial du spermatozoïde de l'Escargot, riche en glycogène, possède certaines des enzymes intervenant dans le métabolisme de ce polysaccharide. Nous avons signalé (Personne et André, 1964; André, 1965) la présence, autour des particules de glycogène, d'une coque protéinique. Nous avons tout lieu de penser que l'enzyme branchante, l' α -glucan phosphorylase et les enzymes qui régissent son activité, phos-

phorylase kinase et phosphorylase phosphatase constituent une partie de ces protéines. Cette activité phosphorylasique a été montrée récemment par Wanson et Drochmans (1967) autour de la particule de glycogène isolée du muscle strié.

Bien qu'il soit possible dans les conditions expérimentales de faire agir la phosphorylase dans le sens de la synthèse, il est généralement considéré que son rôle essentiel dans les conditions physiologiques est dans le sens de la dégradation. Deux observations nous conduisent à envisager, dans le cas de la pièce intermédiaire de l'Escargot, le rôle de cette phosphorylase dans le catabolisme. La première est le fait que nous ne l'avons mise en évidence que dans les spermatozoïdes mûrs, c'est à dire dans des cellules qui ont terminé leur stockage de glycogène. La seconde est due à Ritter et André (Cytochromes in sperm of *Helix*, non publié), qui ont observé par voie spectrophotométrique, que le glycogène pouvait être utilisé oxydativement.

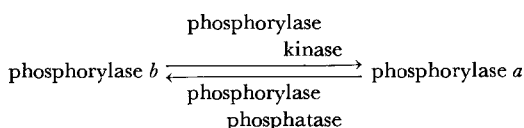
Leloir et Cardini (1957) ont montré que la synthèse du glycogène pouvait se faire aux dépens de l'UDPglucose, sous l'action de l'uridine diphosphoglucose glycogène transférase (2.4.1.11 = UDPglucose: α -1,4-glucan α -4-glucosyltransférase). L'activité de l'UDPglucose glycogène transférase est généralement très faible en comparaison de celle de la phosphorylase. Ainsi, dans l'extrait de muscle, Leloir et al. (1959) ont trouvé une activité de l'UDPglucose glycogène transférase 20 à 50 fois moins importante que celle de la phosphorylase. Il est cependant considéré que c'est l'UDPglucose glycogène transférase qui intervient dans la voie anabolique habituelle du glycogène. La synthèse se faisant lentement, mais de façon continue, ne nécessite qu'une petite quantité d'UDPglucose glycogène transférase. Le glycogène au contraire, en cas de besoin, doit pouvoir être catabolisé rapidement, ce qui implique qu'une grande quantité de phosphorylase soit présente dans les tissus (Leloir, 1964).

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, W. A. 1968. Cytochemistry of sea-urchin gametes. I. Intramitochondrial localization of glycogen, glucose 6-phosphatase and adenosinetriphosphatase in spermatozoa of *Paracentrotus lividus*. *J. Ultrastruct. Res.* **24**:398.
- ANDRÉ, J. 1965. Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries: glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. *Arch. Biol.* **76**:277.

Nous n'avons pu mettre en évidence cytochimiquement l'activité UDPglucose glycogène transférase dans la pièce intermédiaire. Cela peut résulter d'une trop faible activité de cette enzyme, qui, sur notre matériel, dans les conditions de l'expérience, ne permet pas un allongement suffisant des chaînes du glycogène préexistant pour le rendre colorable par l'iode. Il est aussi possible que la synthèse ne soit pas assez importante pour compenser les processus cataboliques. Une autre possibilité est que la synthèse du glycogène se fasse par une autre voie que celle catalysée par l'UDPglucose glycogène transférase.

La présence du système phosphorylasique:



à l'intérieur des mitochondries est une donnée nouvelle à ajouter à la liste des enzymes mitochondriales. Elle permet d'envisager l'utilisation des polysaccharides par certaines mitochondries spécialisées, sous une autre forme que sous la forme dégradée en radicaux acétyl, comme c'est habituellement le cas pour les mitochondries banales.

L'un de nous (P. Personne) remercie vivement le Docteur Wegmann de l'avoir accueilli dans son laboratoire et de l'avoir initié aux techniques de l'histoenzymologie. Nous sommes reconnaissants au Docteur Drochmans de nous avoir fait bénéficier de ses critiques pendant la rédaction de ce manuscrit.

Cette publication fait partie de la thèse de Doctorat d'État ès Sciences Naturelles de Paul Personne. Winston Anderson est un boursier de l'American Cancer Society (P.F. #342).

Ce travail a bénéficié de l'aide du C.N.R.S. (E.R.A. 174) et de la D.R.M.E. (contrat 513/68).

Received for publication 17 March 1969, and in revised form 18 April 1969.

- BEAULATON, J. 1964. Sur l'accumulation intramitochondriale de glycogène dans la glande prothoracique du ver à soie du Chêne *Antherea pernyi* (Guér.) pendant les quatrième et cinquième stades larvaires. *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris* **258**:4139.
- BERTHOLD, C. H. 1966. Ultrastructural appearance of glycogen in the B neurons of the lumbar spinal ganglia of the frog. *J. Ultrastruct. Res.* **14**:254.

- CORI, C. F., ET G. T. CORI. 1945. The activity and crystallization of phosphorylase *b*. *J. Biol. Chem.* 158:341.
- DROCHMANS, P. 1962. Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. *J. Ultrastruct. Res.* 6:141.
- FAIN-MAUREL, M. A. 1966. Localisation intramitochondriale et intracisternale de glycogène monomérique. *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris* 263:1107.
- FISCHER, E. H., ET E. G. KREBS. 1955. Conversion of phosphorylase *b* to phosphorylase *a* in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216:121.
- GREEN, A. A., ET G. T. CORI. 1943. Crystalline muscle phosphorylase. I. Preparation, properties, and molecular weight. *J. Biol. Chem.* 151:21.
- GUHA, S., ET R. WEGMANN. 1959. Etudes sur l'activité phosphorylasique. I. Une nouvelle méthode de mise en évidence de la phosphorylase. *Ann. Histochim.* 4:103.
- HORI, S. H. 1964. Cytological phosphorylase locations in rat liver and muscle as shown by a lead precipitation method. *Stain Technol.* 39:275.
- HSIEN-GIEN SIE, D. SAWYER, ET W. H. FISHMAN. 1966. Enzymorphologic demonstration of glucose 6-phosphate dependent glycogen synthetase in mouse liver. *J. Histochem. Cytochem.* 14:247.
- ISHIKAWA, T., ET Y. F. PEI. 1965. Intramitochondrial glycogen particles in rat retinal receptor cells. *J. Cell Biol.* 25:402.
- KREBS, E. G., ET E. H. FISCHER. 1956. The phosphorylase *b* to *a* converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 20:150.
- KREBS, E. G., A. B. KENT, ET E. H. FISCHER. 1955. Phosphorylase activity in skeletal muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216:113.
- KREBS, E. G., A. B. KENT, ET E. H. FISCHER. 1958. The muscle phosphorylase *b* kinase reaction. *J. Biol. Chem.* 231:73.
- LAKE, B. D. 1966. The histochemistry of phosphatases: the use of lead acetate instead of lead nitrate. *J. Roy. Microsc. Soc.* 85:73.
- LANZA, B., ET D. QUATTRINI. 1964. Osservazioni sul contenuto in glicogeno degli spermatozoi e degli epitelii della gonade e delle vie sessuali ermafrodite di *Vaginulus borellianus* (Colosi) (Mollusca, Gastropoda, Soleolifera). *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.* 40:1154.
- LELOIR, L. F. 1964. Rôle of uridine diphosphate glucose in the synthesis of glycogen. In *Control of Glycogen Metabolism*. W. J. Whelan and M. P. Cameron, editors. Churchill (J. & A.) Ltd., London. 66.
- LELOIR, L. F. ET C. E. CARDINI. 1957. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *J. Amer. Chem. Soc.* 79:6340.
- LELOIR, L. F., J. M. OLAVARRIA, S. H. GOLDEMBERG, ET H. CARMINATTI. 1959. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 81:508.
- LENTZ, T. L. 1966. Intramitochondrial glycogen granules in digestive cells of *Hydra*. *J. Cell Biol.* 29:162.
- LIN, H. S. 1965. Microcylinders within cristae in the rat pinealocyte. *J. Cell Biol.* 25:435.
- LUFT, J. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409.
- MARINOZZI, V. 1967. Réaction de l'acide phosphotungstique avec la mucine et les glycoprotéines des plasmamembranes. *J. Microsc.* 6:68a.
- PERSONNE, P. ET W. A. ANDERSON. 1969. Compartimentage des activités enzymatiques dans le spermatozoïde de certains mollusques gastéropodes. Localisation des déshydrogénases. *J. Cell Sci.* 4:693.
- PERSONNE, P., ET J. ANDRÉ. 1964. Existence de glycogène mitochondrial dans le spermatozoïde de la Testacelle. *J. Microsc.* 3:643.
- RALL, T. W., E. W. SUTHERLAND, ET W. D. WOSILAIT. 1956. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and extracts. *J. Biol. Chem.* 218:483.
- SUTHERLAND, E. W., ET W. D. WOSILAIT. 1956. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. I. Liver phosphorylase preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 218:459.
- SWANSON, M. A. 1948. Studies on the structure of polysaccharides. IV. Relation of the iodine color to the structure. *J. Biol. Chem.* 172:825.
- TAKEUCHI, T. 1958. Histochemical demonstration of branching enzyme (Amylo-1,4 → 1,6-transglucosidase) in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 6:208.
- TAKEUCHI, T., ET H. KURIAKI. 1955. Histochemical demonstration of phosphorylase in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 3:153.
- TANDLER, B., ET F. H. SHIPKEY. 1964. Ultrastructure of Warthin's tumor. I. Mitochondria. *J. Ultrastruct. Res.* 11:292.
- THIÉRY, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* 6:987.
- VENABLE, J. H., ET R. COGGESHALL. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407.
- WANSON, J. C., ET P. DROCHMANS. 1967. Mise en évidence de l'activité phosphorylasique au niveau de la particule de glycogène isolée du muscle strié. *J. Microsc.* 6:88a.
- WOSILAIT, W. D., ET E. W. SUTHERLAND. 1956. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. II. Enzymatic inactivation of liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 218:469.