

International conference on the use
of radioactive isotopes in pharmacology

Conférence internationale sur l'utilisation
des Isotopes radioactifs en pharmacologie

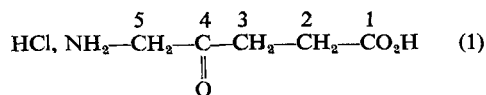
Summaries of reports

Résumés des rapports

Problèmes du choix de méthodes de synthèses chimiques de molécules marquées sur l'exemple de l'acide δ -aminolévulinique ^{14}C et ^3H .

L. PICHAT (Chef du Service des Molécules Marquées, C.E.N., Saclay, France).

On évoquera, en l'illustrant par l'exemple de l'acide- δ -aminolévulinique ^{14}C et ^3H (δ -A.A.L.) (1) précurseur biologique des protoporphyrines, vitamine B_{12} et bilirubine, quelques problèmes du choix de méthodes chimiques de molécules marquées.



a) La méthode choisie peut n'être qu'une adaptation à l'échelle de quelques millimoles, de méthodes déjà utilisées pour préparer le même produit inactif. Ce choix, qui présente l'avantage de bénéficier de données de la littérature, ne se justifie que si le nombre d'étapes radioactives n'est pas prohibitif. L'exemple donné sera celui de la synthèse conçue par Shemin de δ -A.A.L. ^{14}C -5 à partir de malonate d'éthyle ^{14}C -2.

b) La préparation d'une molécule marquée peut exiger la mise au point de routes nouvelles de synthèses, très différentes des méthodes décrites pour la préparation de l'analogue non marqué. La conception du schéma réactionnel

b) The preparation of a labelled compound may require the development of new routes of synthesis, quite different from those described for the synthesis of the un-labelled analogue. The conception of the reaction scheme should be done so as to diminish the number of radioactive stages, to facilitate purification and, from an economic point of view, to use the same starting materials for various labelled products. These considerations have lead us to the development of two methods for the synthesis of δ -A.L.A. ^{14}C , one using glycine ^{14}C -1, or ^{14}C -2, and the other allylacetic carboxyl acid ^{14}C , as starting materials. These methods will be described briefly.

c) The position which one wishes to label with Carbon-14 or Tritium has a decisive influence on the choice of synthetic method. According to the position which one wishes to label, one must design quite different schemes. This will be illustrated by the synthesis of δ -A.L.A. ^{14}C -1 or ^{14}C -2, starting from Sodium acetate ^{14}C -1, or ^{14}C -2 respectively.

d) In the case of tritiated products, the best method of labelling consists of saturation of a double-bond in an ethylenic or acetylenic precursor. With the example of δ -A.L.A. ^3H -2,3 we will show that the preparation of such a precursor : ethyl 5-phthalimido pent-2-ene 4-one oate, may entail a considerable amount of work in the organic chemical preparation, in order that the true radioactive stage may be very short. This approach to the production of δ -A.L.A. will be compared with labelling by exchange with tritiated water.

e) Mention will be made of observations of the stability of δ -A.L.A. ^{14}C and ^3H during storage. At this point the general importance of frequent purity checks of labelled compounds will be underlined; after all, during the production of labelled compounds more time is devoted to analytical controls and purification than to the actual synthesis.

Problems of labelling and purifying quaternary ammonium compounds for their study.

L. CLARK and L. J. ROTH (Department of Pharmacology, The University of Chicago, Chicago, Illinois).

A number of quaternary ammonium compounds find important usage in pharmacology and medicine. Some examples are : 2-PAM, which restores cholinesterase activity; Hexanethonium, a ganglionic blocking agent which has been used in the management of hypertensive cardiovascular disease; and Bretylium, which shows selective inhibitory action on the adrenergic nervous system. Therefore, studies concerned with the penetration, localization and fate of these drugs and/or their metabolites are desirable. Chemical labelling of these compounds provides the sensitive tool necessary for expanding the scope of these studies to include tissues where only minimal drug concentrations are attainable.

In general, a quaternary ammonium compound is prepared by the alkylation of a tertiary amine. Inasmuch as certain ^{14}C or ^3H -labelled alkyl

halides are commercially available, chemical labelling of these compounds might appear routine. It is important to note, however, that if a labelled compound is to be a useful investigative tool it must fulfill the specific activity and radiochemical purity requirements dictated by its proposed experimental application. In other words, while the labelling of a compound for use in one series of studies may pose no special problems, it does not follow, necessarily, that labelling of the same compound for a different set of studies will be routine also. A case in point is the synthesis of methyl-¹⁴C bretylium iodide.

Methyl-¹⁴C bretylium (N-O-bromobenzyl-N-ethyl-N,N-dimethylammonium) iodide has been prepared and used experimentally, as reported by Boura *et al.* Their studies were concerned with distribution of ¹⁴C bretylium in sympathetic nerve ganglia. Accordingly, a specific activity of three (3) millicuries per millimole proved adequate for their purpose. At this level of radioactivity, they observed no detectable radiochemical impurity. They also detected no drug in the central nervous system, except for small amounts in the hypothalamus and area postrema.

The proposed use of methyl-¹⁴C bretylium iodide to investigate possible penetration of this quaternary ammonium compound into the central nervous system would thus seem to require the sensitivity afforded only by higher specific activity.

We anticipated that ethylmethylamine, free of structurally-related contaminants, such as dimethylamine, diethylamine or other low-boiling secondary amines would be of critical importance in this synthesis. Accordingly, we decided upon the scheme : N-ethyl-N-methylaniline → *p*-nitroso N-ethyl-N-methylalinine → ethylmethylamine + a salt of nitrosophenol.

N-ethyl-N-methylaniline, Superior Grade, was listed in the catalogs of several major chemical suppliers. We therefore proceeded with confidence to purchase and use this Superior Grade organic chemical as a starting material. The N-ethyl-N-methylaniline distilled, under reduced pressure, in the correct boiling range. It was therefore nitrosated, and the nitroso-derivate was purified by recrystallization. Subsequently, the nitroso compound was hydrolyzed and the highly volatile secondary amine was collected with the aid of a cold trap. This product was condensed with *o*-bromobenzyl bromide to yield a tertiary amine. The tertiary amine gave a quaternary ammonium compound which according to its physical and pharmacological properties seemed to be the presumed bretylium.

The melting point of bretylium iodide, as is true with most quaternary ammonium compounds, is not a reliable criterion of purity, or, as we were to discover, identity. Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis of this product (bretylium) identified it as N-*o*-bromobenzyl-N,N,N-trimethylammonium iodide, rather than the desired ethyl, dimethyl derivative.

In order to resolve this discrepancy, we further characterized the commercially-obtained "N-ethyl-N-methylaniline" from which our "ethylmethylamine" was synthesized. Two solid derivatives, prepared from a sample of this commercial product, gave melting point values which ruled out the product as N-ethyl-N-methylaniline. Accordingly, the supplier and the manufacturers were notified. Their investigation confirmed our findings.

Subsequent attempts at synthesis of the correct compound, by the

manufacturers resulted in a product which, according to their analysis contained 93% N-ethyl-N-methylaniline and 7% N,N-dimethylaniline. This was the highest purity they were able to achieve.

We therefore were forced to devise our own synthesis of chemically pure N-ethyl-N-methylaniline. We started with N-methylaniline which we acetylated to N-acetyl-N-methylaniline. This latter compound was purified, first by distillation at atmospheric pressure, then recrystallization successively from alcohol and petroleum ether. This product was then de-acetylated, subjected to fractional distillation under reduced pressure and treated with ethyl bromide to give ethylmethylaniline. This secondary amine was then condensed with *o*-bromobenzyl bromide to yield *o*-bromobenzyl-N-ethyl-N-methylamine, which, after purification gave the correct NMR spectrum.

Our effort to utilize the tertiary amine identified as N-*o*-bromobenzyl-N-ethyl-N-methylamine in the synthesis of radiochemically pure méthyl-¹⁴C bretylium with a specific activity of ten (10) millicuries per millimole met with apparent success. However, when higher specific activity (25-50 millicuries/millimole) were required, several radioactive impurities were detected by means of chromatography. Additional recrystallization of the product neither removed nor minimized these impurities.

In view of the instability of quaternary ammonium compounds with respect to heat, as well as their non-volatile nature, gas chromatography could not be used to establish the purity of bretylium. We were able, however, to analyze the tertiary amine, using a Hewlett-Packard Series 402 High Efficiency Gas Chromatograph. Three impurities, representing approximating one-half of one per cent of the sample were detected.

In order to remove these minimal but critical impurities we turned to preparative gas chromatography and through repeated operations, obtained a purified sample of N-*o*-bromobenzyl-N-ethyl-N-methylamine in sufficient amount for synthesis of chemically pure methyl-¹⁴C bretylium. The product thus prepared, with a specific activity of 50 millicuries/millimole was subjected to thin layer chromatography in several solvent systems. In only one system could any radioactive impurity be detected. This impurity represented less than one-tenth of one per cent of radioactivity of the sample.

Problèmes de marquage et purification de composés à ammonium quaternaire pour leur étude.

L. CLARK et L. J. ROTH (Department of Pharmacology, The University of Chicago, Chicago, Illinois).

Un certain nombre de composés à ammonium quaternaire trouvent une importante utilisation en pharmacologie et en médecine. Des exemples en sont donnés par le 2-PAM, qui rétablit l'activité de la cholinestérase; par l'hexaméthonium, agent de blocage ganglionnaire, qui a été employé dans le traitement des maladies cardiovasculaires hypertensives; et par le brétylium, qui montre une action sélective d'inhibition sur le système nerveux adrénergique. Donc, des études concernant la pénétration, la localisation et le sort de ces

médicaments et/ou de leurs métabolites sont désirables. Le marquage chimique de ces composés donne l'instrument sensible nécessaire pour atteindre le but de ces études, jusqu'à inclure des tissus où l'on trouve seulement des concentrations minimales de médicaments.

En général, un composé à ammonium quaternaire est préparé par l'alkylation d'une amine tertiaire. Comme certains alkylalogénures marqués par ^{14}C ou par ^3H existent dans le commerce, le marquage chimique de ces composés pourrait sembler une opération de routine. Cependant, il est important de remarquer que, si un composé marqué doit être un instrument de recherche utile, il doit posséder l'activité spécifique et la pureté radiochimique nécessaires pour l'application expérimentale que l'on s'est proposée. C'est-à-dire, que si le marquage d'un composé pour son emploi dans une série d'études ne pose pas de problèmes particuliers, il ne s'en suit pas nécessairement que le marquage du même composé pour une série différente d'études soit tout aussi facile. Un exemple est donné par la synthèse de l'iodure de méthyl-brétylium- ^{14}C .

L'iodure de méthyl-brétylium- ^{14}C (N-O-bromobenzyl-N-éthyl-N,N-diméthyl-ammonium) a été préparé et employé expérimentalement, comme l'ont indiqué Boura *et al.* Leurs études concernaient la distribution du brétylium- ^{14}C dans les ganglions d'un nerf sympathique. En conséquence, une activité spécifique de 3 mC/mM était appropriée à leur dessein. A ce niveau de radioactivité, ils n'observèrent aucune impureté radiochimique détectable. Ils ne détectèrent pas non plus de médicament dans le système nerveux central, à part de petites quantités dans l'hypothalamus et dans l'area postrema.

L'emploi proposé de l'iodure de méthyl-brétylium- ^{14}C pour rechercher la pénétration possible de ce composé à ammonium quaternaire dans le système nerveux central semblerait donc exiger la sensibilité fournie seulement par une activité spécifique plus élevée.

Nous avons déjà dit que l'éthylméthylamine, exempte de contaminants apparentés structurellement, tels que la diméthylamine, la diéthylamine ou d'autres amines secondaires à point d'ébullition bas, serait d'importance considérable dans cette synthèse. En conséquence, nous avons décidé de réaliser le schéma suivant : N-éthyl-N-méthylaniline \rightarrow *p*-nitroso N-éthyl-N-méthylaniline \rightarrow éthyl méthylamine + un sel de nitrosophénol.

La N-éthyl-N-méthylaniline, d'un degré de pureté supérieur, a été trouvée dans les catalogues de plusieurs grands fournisseurs de produits chimiques. Nous avons donc acheté et employé avec confiance ce produit chimique organique d'un degré de pureté supérieur comme matériel de départ. La N-éthyl-N-méthylaniline fut distillée, sous pression réduite, dans l'intervalle exact de température d'ébullition. Elle fut donc nitrosée, et le nitroso-dérivé fut purifié par recristallisation. Ensuite, le nitroso-composé fut hydrolysé, et l'amine secondaire, très volatile, fut condensée dans un récipient froid. Ce produit fut combiné avec du bromure d'*o*-bromobenzyl pour obtenir une amine tertiaire. L'amine tertiaire donna un composé à ammonium quaternaire, lequel, d'après ses propriétés physiques et pharmacologiques, parut être le brétylium présumé.

Le point de fusion de l'iodure de brétylium, ainsi que celui de la plupart des composés à ammonium quaternaire, n'est pas un critère sûr de pureté ou, comme nous avons pu le découvrir, un caractère d'identité. L'analyse par

la résonance magnétique nucléaire (NMR) de ce produit (brétylium) l'a identifié comme étant l'iodure de N-*o*-bromobenzyl-N, N, N-triméthylammonium, plutôt que comme le dérivé éthyl. diméthyl recherché.

Afin d'expliquer cette discordance, nous avons ensuite caractérisé la « N-éthyl-N-méthylaniline » obtenue dans le commerce, à partir de laquelle notre « éthyl-méthylaniline » avait été synthétisée. Deux dérivés solides, préparés avec un échantillon de ce produit commercial, ont donné des points de fusion qui ont identifié le produit comme n'étant pas la N-éthyl-N-méthylaniline. En conséquence, le fournisseur et les fabricants en ont été avertis. Leurs recherches ont confirmé notre découverte.

Des tentatives ultérieures faites par des fabricants de synthétiser le composé correct, ont donné un produit qui, selon leur analyse, contenait 93 % de N-éthyl-N-méthylaniline et 7 % de N,N-diméthylaniline. Ce fut le degré de pureté le plus élevé qu'ils purent obtenir.

Nous avons donc été forcés de mettre sur pied notre synthèse avec de la N-éthyl-N-méthylaniline chimiquement pure. Nous sommes partis de la N-méthylaniline, que nous avons acétylée en N-acétyl-N-méthylaniline. Ce dernier composé a d'abord été purifié par distillation à la pression atmosphérique, et ensuite par recristallisation dans l'alcool et l'éther de pétrole. Ce produit a ensuite été désacétylé, soumis à distillation fractionnée sous pression réduite et traité avec du bromure d'éthyle pour donner de l'éthylméthylamine. Cette amine secondaire a ensuite été condensée avec du bromure d'*o*-bromobenzyle, pour obtenir l'*o*-bromobenzyl-N-éthyl-N-méthylamine, laquelle — après purification — a donné le spectre correct du NMR.

Notre effort pour utiliser l'amine tertiaire identifiée comme N-*o*-bromobenzyl-N-éthyl-N-méthylamine dans la synthèse du méthyl-brétylium-¹⁴C radiochimiquement pur avec une activité spécifique de 10 mC/mM a eu un succès évident. Cependant, quand il fallut une activité spécifique plus élevée (25-50 mC/mM), de nombreuses impuretés radioactives furent découvertes par chromatographie. Une recristallisation additionnelle du produit n'a ni supprimé ni diminué ces impuretés.

A cause de l'instabilité à la chaleur des composés à ammonium quaternaire, ainsi que de leur nature non-volatile, la chromatographie en phase gazeuse n'a pas pu être employée pour établir la pureté du brétylium. Cependant, nous avons pu analyser l'amine tertiaire, en employant une chromatographie en phase gazeuse Hewlett-Packard Série 402 à capacité très élevée. Trois impuretés, représentant approximativement 0,5 % de l'échantillon, ont été détectées.

Afin de supprimer ces impuretés minimales mais objets de critiques, nous avons eu recours à la chromatographie préparatoire en phase gazeuse et, par des opérations répétées, nous avons obtenu un échantillon purifié de N-*o*-bromobenzyl-N-éthyl-N-méthylamine en quantité suffisante pour la synthèse du méthyl-brétylium-¹⁴C chimiquement pur. Le produit préparé de cette façon, avec une activité spécifique de 50 mC/mM, a été soumis à une chromatographie sur couche mince dans de nombreux systèmes solvants. On a pu détecter une impureté radioactive dans un seul système. Cette impureté représentait moins de 0,1 % de la radioactivité de l'échantillon.

Stability of radioactive chemicals and drugs.

J. R. CATCH (The Radiochemical Centre, Amersham, England).

1. Research workers using labelled compounds in pharmacology do not willingly interest themselves in the decomposition of labelled compounds. It is an annoyance to users of labelled compounds (and incidentally to producers of labelled compounds also) because it produces impurities which may spoil the experimental results.

Before discussing stability, it is necessary to review briefly some aspects of purity and analysis of labelled compounds, particularly in the context of their use in pharmacology.

1.1. *Absolute purity* is an ideal which is never attained in practice. The purity required depends on the use to be made of the compound and the information sought. Purity should be expressed quantitatively.

1.2. *Purity for tracer compounds* has some novel dimensions; most important is the distinction between chemical and radiochemical purity.

1.3. *The criteria of purity for labelled compounds* are sometimes different, and usually more exacting, than for compounds used in "classical" (non-radioactive) biochemistry or pharmacology, or clinical use.

1.4. *Very small mass quantities* are often handled.

1.5. *Preparative methods* are often different from those used for the unlabelled compounds, and therefore produce different impurities.

1.6. *All impurities may be labelled* and therefore detected even in very low levels. Purely chemical and physical methods of analysis often miss small quantities of impurity, which are not detected in the system used.

1.7. Little or nothing is usually known about the *radiolytic decomposition* of a complex organic compound, or it may be observed only empirically.

1.8. Particular care is needed to avoid *artefacts, and deficiencies, of analysis*.

2. The decomposition of a labelled compound is not always the result of radioactivity. It may be a purely chemical or microbiological phenomenon.

3. Certain precautions should therefore be taken to prevent or reduce chemical or microbiological decomposition, particularly because of the small mass quantities which may be used.

4. The basic phenomena of radiolytic decomposition :

4.1. Primary (internal) effect;

4.2. Primary (external) effect;

4.3. Secondary effects.

5. Precautions to reduce radiolytic decomposition :

5.1. Distribution;

5.2. Dilution;

5.3. Purity : scavengers;

5.4. Temperature.

6. Throughout the review examples will be given to illustrate particular points, many of them drawn from experience at the Radiochemical Centre.

La stabilité des produits chimiques et des médicaments radioactifs.

J. R. CATCH (The Radiochemical Centre, Amersham, England).

1. Les chercheurs qui emploient les molécules marquées en pharmacologie ne s'intéressent pas volontiers à la décomposition des molécules marquées. Elle est une source de désagrément pour les utilisateurs des molécules marquées (et incidemment pour les fabricants des molécules marquées aussi) parce qu'elle produit des impuretés qui peuvent fausser les résultats expérimentaux.

Avant de discuter la stabilité, il est nécessaire de passer brièvement en revue quelques aspects de la pureté et de l'analyse des molécules marquées, particulièrement dans le contexte de leur usage en pharmacologie.

1.1. *La pureté absolue* est un idéal qui, en pratique, n'est jamais atteint. La pureté exigée dépend de l'usage qui sera fait de la molécule, et de l'information cherchée. La pureté devrait être exprimée quantitativement.

1.2. *La pureté pour les molécules marquées* a une importance quelque peu variable; la plus importante est la distinction entre la pureté chimique et la pureté radiochimique.

1.3. *Les critères de pureté pour les molécules marquées* sont parfois différents, et généralement plus sévères, que pour les molécules employées en biochimie ou en pharmacologie « classiques » (non radioactives), ou pour l'usage clinique.

1.4. *De très petites quantités par rapport à la masse* sont souvent traitées.

1.5. *Les méthodes de préparation* sont souvent différentes de celles employées pour les molécules non marquées, et produisent donc des impuretés différentes.

1.6. Toutes les impuretés peuvent être marquées et donc détectées, même en quantités très faibles. Les méthodes chimiques et physiques d'analyse ne permettent souvent pas de détecter de petites quantités d'impureté, qui ne sont pas décelables par la méthode employée.

1.7. Peu de choses ou rien n'est connu généralement sur la *décomposition radiolytique* d'une molécule organique complexe, ou bien ne peut être observé qu'empiriquement.

1.8. Il faut un soin particulier pour éviter les artefacts et les déficiences de l'analyse.

2. La décomposition d'une molécule marquée n'est pas toujours le résultat de la radioactivité. Elle peut être un phénomène purement chimique ou microbiologique.

3. Certaines précautions devraient donc être prises pour prévenir ou réduire la décomposition chimique ou microbiologique, particulièrement à cause des petites quantités, par rapport à la masse, qui peuvent être employées.

4. Les phénomènes de base de la décomposition radiolytique sont les suivants :

4.1. L'effet primaire (interne);

4.2. L'effet primaire (externe);

4.3. Les effets secondaires.

5. Les précautions à prendre pour diminuer la décomposition radiolytique sont les suivantes :

- 5.1. La distribution;
- 5.2. La dilution;
- 5.3. La pureté;
- 5.4. La température.

6. Au cours de cet exposé, des exemples seront donnés pour illustrer des points particuliers, dont plusieurs sont tirés de notre expérience au Centre Radiochimique.

Etude des molécules marquées par spectrographie de masse.

Study of labelled compounds by mass spectrography.

R. H. MARTIN (Laboratoire de chimie organique, Université Libre, Bruxelles, Belgique).

Le résumé du rapport ne nous est pas parvenu.

The summary of this report did not reach us.

Isotope dilution analysis with the aid of preparative thin-layer chromatography.

K. SCHMID (Research Laboratories, Pharmaceutical Division, CIBA Limited, Basle, Switzerland).

The isotope dilution method is an excellent analytical technique for the quantitative determination of individual components contained in a mixture of substances. Where the classic procedure is adopted, an exact quantity of the compound to be analysed is added in labelled form to the mixture, following which an aliquot of the compound is isolated in its purest state. After the degree of dilution has been determined, the concentration present in the mixture can be calculated. If the compound to be analysed is present in the mixture in labelled form, it can be determined in a similar manner by adding a measured quantity of non-labelled substance; in this case, the method is referred to as inverse isotope dilution.

A great variety of uses for this latter procedure can be found in pharmacokinetic studies involving radioactively labelled compounds. Bearing in mind the complex nature of the biological specimens employed in such studies, one of the main advantages of this technique is that the substance to be analysed does not need to be isolated quantitatively. On the other hand, the fact that the specimens and the concentrations involved are so small, and that products very similar to one another may be present, means that the purification process must be an extremely good one and the method of measuring the dilution extremely sensitive. In view of these requirements, preparative thin-layer chromatography has proved highly suitable as a method of isolation and purification. The versatility of this method is discussed in detail and illustrated by reference to a few examples of experiments in which it has been used. One

example relates to the simultaneous determination of two compounds each having a similar structure, and another example shows how, following administration of a mixture of isomers, the isomers were then analysed. A third example deals with the simultaneous determination of two compounds which showed no difference in their R_f values; here, labelling with different isotopes was also resorted to as an additional aid.

When employing the isotope dilution technique, one has to be able to determine with the highest possible degree of sensitivity the total radioactivity of the specimens to be used for the analysis. For this purpose, the most suitable method is liquid scintillation assay in the combination with oxygen-flask combustion. Even where this latter process has been applied, it is often possible to attain the limit at which the radioactivity can still be reliably measured. This applies particularly to studies on human subjects as well as to cases in which two isotopes are being determined simultaneously. A modification of the oxygen-flask combustion technique has made it possible to develop a method by which the total radioactivity of biological specimens can be measured to a degree of sensitivity greater by a factor of at least 5. A description is given of the principle underlying this method, which can suitably be employed to determine a single radio-isotope as well as two different isotopes (e.g. carbon 14 and tritium).

Analyse de dilution isotopique à l'aide de chromatographie préparatoire sur couche mince.

K. SCHMID (Laboratoires de Recherches, division pharmaceutique, CIBA, Bâle, Suisse).

La méthode de la dilution isotopique est une excellente technique analytique pour la détermination quantitative des composants individuels contenus dans un mélange de substances.

Quand on adopte le procédé classique, une quantité exacte du composé à analyser est ajoutée sous forme marquée au mélange, suivant lequel une partie aliquote du composé est isolée dans son état le plus pur. Après avoir déterminé le degré de dilution, on peut calculer la concentration présente dans le mélange.

Si le composé à analyser est présent dans le mélange sous forme marquée, il peut être déterminé d'une manière analogue en ajoutant une quantité mesurée de substance non marquée; dans ce cas, la méthode est reportée comme la dilution isotopique inverse.

Une grande variété d'emplois pour ce dernier procédé peut être trouvée dans des études pharmacologiques impliquant des composés marqués radioactifs. Si on pense à la nature complexe des échantillons biologiques employés dans de telles études, l'un des principaux avantages de cette technique est que la substance à analyser n'a pas besoin d'être isolée quantitativement. D'autre part, le fait que les échantillons et les concentrations impliquées sont tellement réduits et que des produits très semblables les uns aux autres peuvent être présents, signifie que le procédé de purification doit être un procédé extrêmement bon et la méthode pour mesurer la dilution extrêmement

sensible. Dans ces perspectives, la chromatographie préparatoire sur couche mince s'est montrée très appropriée comme méthode d'isolement et de purification. La variabilité de cette méthode est discutée en détail et illustrée en se référant à quelques exemples d'expériences où elle a été employée. Un exemple se rapporte à la détermination simultanée de deux composés ayant chacun une structure semblable, et un autre exemple montre comment, après administration d'un mélange d'isomères, les isomères furent alors analysés. Un troisième exemple traite de la détermination simultanée de deux composés, qui ne montrent aucune différence dans leurs valeurs R_f ; dans ce cas, on a dû recourir au marquage avec des isotopes différents comme aide additionnelle.

Quand on emploie la technique de la dilution isotopique, on doit être capable de déterminer avec le plus haut degré possible de sensibilité la radioactivité totale des échantillons qui doivent être employés pour l'analyse. Dans ce but, la méthode la plus appropriée est la scintillation liquide en combinaison avec l'« oxygen-flask combustion ». Même là où ce dernier procédé a été appliqué, il est souvent possible d'atteindre la limite à laquelle la radioactivité peut être encore bien mesurée. Ceci s'applique particulièrement à des études sur des sujets humains ainsi que dans des cas où deux isotopes doivent être déterminés simultanément. Une modification de la technique de l'« oxygen-flask combustion » a donné la possibilité de développer une méthode par laquelle on peut mesurer la radioactivité totale des échantillons biologiques jusqu'à un degré de sensibilité plus grande qu'avec un facteur d'au moins 5. On donne une description du principe servant de base à cette méthode qui peut convenablement être employée pour déterminer un seul radioisotope aussi bien que deux différents isotopes (par exemple, carbone 14 et tritium).

Applications biologiques et pharmacologiques de l'analyse par activation.

D. COMAR (Commissariat à l'Energie Atomique, Département de Biologie, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 91-Orsay, France).

L'analyse par activation est une des méthodes les plus sensibles pour le dosage des éléments. Après irradiation des échantillons par des neutrons produits dans les réacteurs nucléaires ou les générateurs de neutrons, par des particules chargées ou des rayonnements électromagnétiques, la radioactivité des éléments formés est mesurée comparativement à celle d'un étalon irradié et traité dans les mêmes conditions.

Les principaux aspects technologiques de cette méthode seront évoqués particulièrement dans le cas du dosage des éléments dans les milieux biologiques. Quelques exemples spécifiques montreront les possibilités offertes par cette méthode dans le domaine biologique et pharmacologique.

L'étude de la répartition des oligoéléments dans l'organisme du sujet normal et pathologique est grandement facilitée grâce à l'analyse par activation. La possibilité de doser simultanément de 20 à 30 éléments dans une prise d'essai de quelques milligrammes a été menée à profit pour comparer la

composition élémentaire de tissus normaux et tumoraux. L'influence de médicaments du type de la phénothiazine ou de certains corticoïdes sur le métabolisme du manganèse chez l'animal et chez l'homme a pu également être étudiée.

La recherche du rôle biologique éventuel d'un oligoélément doit être accompagnée de l'étude de son absorption et de son métabolisme. L'action inhibitrice du vanadium sur la synthèse du cholestérol décrite *in vitro* a été recherchée *in vivo* chez l'animal, le vanadium ayant été administré par voie orale et sous-cutanée.

Sur un plan plus technologique, l'analyse par activation a été utilisée pour contrôler des préparations homéopathiques et pour caractériser des acides nucléiques de différentes origines.

Dans beaucoup de cas et particulièrement chez l'homme, il n'est pas possible d'utiliser un radioélément pour pratiquer un diagnostic ou une épreuve métabolique en raison de la dose d'irradiation qui serait délivrée à l'organisme. Cet argument est principalement valable dans le cas de l'exploration fonctionnelle chez l'enfant, ou bien chez l'adulte lorsque les seuls radioéléments disponibles ont une période longue vis-à-vis du phénomène physiologique étudié. L'analyse par activation étant une méthode de dosage isotopique, on peut envisager, si l'on dispose à l'état pur d'un isotope rare, de l'utiliser comme indicateur. Cette méthode à l'heure actuelle a été employée en médecine pour suivre le renouvellement de l'iode chez l'homme pendant près d'un an, et du calcium chez l'enfant. Le brome naturel peut également remplacer le brome radioactif généralement utilisé pour la mesure du liquide extracellulaire.

En biochimie, l'eau marquée (H_2O^{18}) a permis de mesurer la vitesse du métabolisme des composés phosphorylés intracellulaires dans le muscle cardiaque; de même l'étude de l'incorporation de l'oxygène 18 dans la vitamine A *in vivo* a été rendue possible.

Dans le domaine de la pharmacologie, le métabolisme des médicaments antimoniés est étudié à l'heure actuelle chez des sujets atteints de bilharziose et en cours de traitement par le tartre émétique ou l'astiban. La très grande sensibilité de l'analyse par activation permet de mesurer la concentration de l'antimoine dans les parasites pris isolément.

Un certain nombre d'explorations fonctionnelles de la glande thyroïde fondées sur le dosage de l'iode hormonal sanguin après stimulation ou freinage de la thyroïde par des agents médicamenteux ont été mises au point.

L'analyse par activation permet dans certains cas de pratiquer des analyses non destructives. Cette possibilité a été mise à profit récemment pour doser *in vivo* chez l'animal et chez l'homme, l'iode total de la thyroïde, ainsi que le sodium et le calcium total de l'organisme.

Biological and pharmacological applications of activation analysis.

D. COMAR (Commissariat à l'Énergie Atomique, Département de Biologie, Service Hospitalier, Frédéric Joliot, 91-Orsay, France).

Activation analysis is one of the most sensitive methods of element determination. A sample is irradiated with neutrons from a nuclear reactor or neutron generator, or with charged particles or electromagnetic radiations, and the radioactivity of the elements formed is compared with that of a standard treated in the same way.

The principal technological aspects of this method will be considered particularly for the case of element determination in biological media. Some specific examples will show the possibilities offered by this method in the field of biology and pharmacology.

The study of the distribution of trace elements throughout the organism in the normal and pathological subject is much facilitated by activation analysis. The possibility of estimating 20 or 30 elements in a sample of a few milligrammes has led to improvements in the comparison of the elementary composition of normal and tumour tissues. It has also been made possible to study the influence of phenothiazine-like drugs, or certain corticoids on manganese metabolism in man and in animals.

Research into the eventual biological rôle of a trace element should be accompanied by the study of its absorption and metabolism. The *in vivo* inhibitory action of vanadium on cholesterol was observed in the animal, the vanadium having been administered by the oral or sub-cutaneous route.

On a more technological level, activation analysis has been used in the standardisation of homeopathic solutions and in the characterisation of nucleic acids of different origins.

In many cases, and especially in man, it is not possible to use a radioelement during diagnosis or metabolic tests because of the dose of radiation which would be delivered to the organism. This argument is valid principally in the case of functional exploration in the child, or even in the adult, when the only available radioelements have a long life relatively to the physiological function studied.

Since activation analysis is a method of isotopic determination, one can envisage that it may be possible to use a pure rare isotope as an indicator. This method has been used in medicine to follow the renewal of iodine in man over a period of almost a year, and that of calcium in the child. Natural bromine may also replace the radio-bromine generally used in the measurement of extra-cellular fluid.

In biochemistry, labelled water (H_2O^{18}) has enabled one to measure the rate of metabolism of intra-cellular phosphorylated compounds in cardiac muscle. The study of oxygen 18 incorporation into vitamin A has also been made possible.

In the field of pharmacology, the metabolism of the antimonial drugs has been studied recently in bilharzia sufferers undergoing treatment with emetic tartar or astiban. The high sensitivity of the method allows the determination of antimony concentration in isolated parasites.

Some functional explorations of the thyroid gland, based on the blood-level of hormonal iodine after stimulation or depression of the thyroid by therapeutic agents, have been developed.

In certain cases activation analysis permits the performance of non-destructive analysis. This possibility has been exploited recently in the determination of the *in vivo* total iodine of the thyroid in animals and in man, as well as the total sodium and calcium content of the organism.

Gas-liquid radiochromatography.

C. H. HITCHCOCK (Biosynthesis Section, Unilever Research Laboratory, Sharnbroock, Bedford, England).

The use of radioactive tracers in metabolic studies often involves the analysis of complex biological mixtures containing labelled metabolites. If such a mixture can be investigated by gas-liquid chromatography, discrete fractions may be condensed for counting as the mass detector records a peak; since metabolites of high specific activity might not be detectable, fractions may also be collected at time intervals between recorded peaks. This discontinuous approach is inefficient and tedious, and attention has been directed towards techniques in which the eluate from a gas-liquid chromatograph is automatically and continuously monitored for radioactivity. Several designs for gas-liquid radiochromatographs have been described, each involving different flow systems or methods of detection. Nine machines based on the design of James and Piper (*Analyt. Chem.*, **35** : 515 [1963]) and later modified (Hitchcock and James, *Kerntechnik.*, **7** : 5 ([1965]) have been built in our laboratory, and are in continuous use for investigations of lipid metabolism by tracer techniques. The principle of the apparatus involves combustion of the eluate in argon on copper oxide, reduction of the water formed to hydrogen, continuous measurement of hydrogen concentration in a katharometer and of radioactivity in a proportional counter. Both detectors operate at ambient temperature; their lower limits are less than 1 μg and 1 $\text{m}\mu\text{c}$ of fatty acid methyl ester. Upper limits are set by the capacity of the column. Latest modifications include provision for temperature programming.

Radiochromatographie gaz-liquide.

C. H. HITCHCOCK (Biosynthesis Section, Unilever Research Laboratory, Sharnbroock, Bedford, England).

L'emploi des traceurs radioactifs dans les études métaboliques implique souvent l'analyse de mélanges biologiques complexes renfermant des métabolites marqués. Si un tel mélange peut être examiné par chromatographie gaz-liquide, des fractions séparées peuvent être condensées pour être comptées

chaque fois que le détecteur de masse enregistre un pic; puisque les métabolites d'activité spécifique élevée pourraient ne pas être détectés, on peut aussi recueillir des fractions à des intervalles de temps entre les pics enregistrés. Cette approximation discontinue est inefficace et ennuyeuse, et on a pensé à s'adresser à des techniques dans lesquelles l'éluat d'un chromatographe gaz-liquide est automatiquement et continuellement capté pour la mesure de la radioactivité. De nombreuses courbes de radiochromatographes gaz-liquide ont été décrites, dont chacune implique différents systèmes de flux ou méthodes de détection. Neuf appareils basés sur les courbes de James et Piper (*Analyt. Chem.*, **35** : 515 [1963]) et ensuite modifiées (Hitchcock et James, *Kerntechnik*, **7** : 5 [1965]) ont été construits dans notre laboratoire, et sont continuellement employés pour l'étude du métabolisme des lipides à l'aide des traceurs radioactifs. Le principe du dispositif implique la combustion de l'éluat dans l'argon sur oxyde de cuivre, la réduction de l'eau formée en hydrogène, la mesure en continu de la concentration d'hydrogène dans un katharomètre et de la radioactivité dans un compteur proportionnel. Les deux détecteurs fonctionnent à la température ambiante; leurs limites inférieures sont plus petites que 1 µg et 1 mµc d'ester méthylé d'acide gras. Les limites supérieures sont établies par la capacité de la colonne. Les dernières modifications prévoient la programmation de température.

Autoradiography of drugs at histologic levels.

L. J. ROTH and W. E. STUMPF (Department of Pharmacology, The University of Chicago, Chicago, Illinois)

The elucidation of drug action at cellular and subcellular levels is fundamental to pharmacology. The precise localization of drugs in tissue has, in many cases, however, been impossible due to the minute amounts of drug involved and to the reversibility of the drug-receptor complex.

Radioactivity and autoradiography were simultaneous discoveries and it soon became apparent that the photographic emulsion could be used to detect minute quantities of radioactivity in tissue at both the organismic and cellular levels. The hopes for autoradiography in experimental biology have frequently been frustrated because classical methods of tissue preparation have been utilized which involved adaptation of older techniques, more often than not, without experimental justification. Many laboratories continue to use fixation, graded solvent dehydration, embedding, de-embedding and wet-mounting without due consideration for the possibility of translocation of the tracer, an event which invalidates the autoradiogram.

Pharmacological activity, in many cases, implies blocking or reversal of the drug-receptor complex, which in turn may be a reflection of weak bonding forces. If the pharmacologist wishes to determine the localization of drugs at various stages of their action by high resolution autoradiography, it is imperative that the methodology used to make such measurements does

not result in leaching, translocation or changes in tissue architecture. The successful localization of a labelled entity by autoradiography depends, therefore, on the degree to which the above objectives are attained. In pursuit of these goals, we have investigated the sectioning of frozen tissue at temperatures of -60°C to -90°C which are lower than those commonly recommended. In our laboratory, frozen sections $0.5\ \mu$ to $1.0\ \mu$ thick, cut in this manner, have been freeze-dried at -68°C , and dry mounted on dried photographic emulsion under conditions of controlled low humidity. Liver, kidney, parotid gland, heart muscle and bone have been sectioned and freeze-dried in this manner. The histological quality of such sections has been excellent as demonstrated by phase contrast microscopy. The rates of freeze-drying have been determined for liver, brain and kidney, using an electro-balance and a simple system of cryosorption pumping. Unembedded freeze-dried frozen sections have also been found valuable in the study of fluorescent compounds.

Autoradiograms prepared by dry mounting of thin, freeze-dried, frozen sections, dry mounted on dried emulsion, have made it possible to distinguish nuclear from cytoplasmic localization in brain and uterine tissue; to delineate radioactivity within canaliculi in the biliary system of the liver and the extracellular space in nervous tissue. The technique has been used to study the cellular localization of labeled drugs in nervous tissue, liver, uterus, and heart muscle. The distribution of ^3H methoxy-inulin has been studied in the superior cervical and nodose ganglia of the cat following close arterial injection of the ganglia. High activity was found over regions of loose connective tissue and the extra neuronal areas within the ganglia. The canaliculi and bile ducts of the liver were delineated by the use of ^3H mesobilirubinogen which is rapidly excreted following intravenous injection. Cytoplasmic localization of ^3H digoxin in cardiac tissue has been confirmed and the cellular localization of ^3H labeled acetazolamide in brain has been found. The localization of ^3H estradiol in the nuclei of uterine cells and its nuclear localization in neuronal elements of the central nervous system has been clarified.

REFERENCES

1. STUMPF, W. E. and ROTH, L. J. — *J. Histochem. and Cytochem.*, **14** : 274 (1966).
2. STUMPF, W. E. and ROTH, L. J. — *J. Histochem. and Cytochem.*, **15** : 243 (1967).
3. BROWN, D. A., ROTH, L. J. and STUMPF, W. E. — The Physiological Society London Meeting, March, 1967 (Abstract).

Autoradiographie des médicaments au niveau histologique.

L. J. ROTH et W. E. STUMPF (Department of Pharmacology, The University of Chicago, Chicago, Illinois).

L'explication de l'action des médicaments au niveau cellulaire et subcellulaire est essentielle en pharmacologie. Cependant, la localisation exacte des médicaments dans les tissus est souvent presque impossible, à cause

des petites quantités de médicaments mis en œuvre, et à cause de la réversibilité du complexe médicament-récepteur.

La radioactivité et l'autoradiographie ont été découvertes simultanément, et l'on s'est aperçu très rapidement que l'émulsion photographique pouvait être employée pour détecter des quantités minimales de radioactivité dans les tissus, au niveau soit de l'organisme, soit de la cellule. Les espoirs concernant l'autoradiographie dans la biologie expérimentale ont souvent été déçus, car pour la préparation des tissus on employait des méthodes classiques qui impliquaient l'adaptation de vieilles techniques, souvent sans justification expérimentale. De nombreux laboratoires continuent à employer la fixation, la déshydratation par solvants successifs, l'inclusion, la désinclusion et le montage humide, sans considérer la possibilité de transposition du traceur, qui peut rendre l'autoradiographie moins valable.

L'activité pharmacologique, dans beaucoup de cas, implique le blocage ou le renversement du complexe médicament-récepteur, lequel, à son tour, peut être un reflet de forces à faibles liaisons. Si le pharmacologue veut déterminer la localisation des médicaments à différents stades de leur action par l'autoradiographie de détermination de valeur élevée, il est absolument nécessaire que la méthodologie employée pour de telles mesures ne produise pas de filtration de transposition ou de changements dans l'architecture des tissus. Le succès de la localisation d'un médicament marqué, au moyen de la technique de l'autoradiographie, dépend donc du degré avec lequel les objectifs précédents ont été atteints. Pour poursuivre ces buts, nous avons examiné des sections de tissus congelés à des températures de -60°C à -90°C , températures plus basses que celles communément recommandées. Dans notre laboratoire, des sections congelées de l'épaisseur de 0,5 à 1,0 μ , coupées de cette façon, ont été séchées à -68°C et ensuite montées sur une émulsion photographique sèche dans des conditions d'humidité contrôlée. Le foie, les reins, la glande parotide, le muscle cardiaque et les os ont été sectionnés et séchés à froid de cette façon. La qualité histologique de telles sections était excellente, comme il a été démontré par la microscopie de contraste de phase. Les vitesses de séchage à froid ont été déterminées pour le foie, le cerveau et les reins, en employant une électrobalance et un simple système de pompage par cryosorption. Des sections congelées, séchées à froid et non incluses, ont également été trouvées valables dans l'étude de composés fluorescents.

Des autoradiogrammes préparés par le montage à sec de sections minces, séchées à froid, congelées, montées à sec sur une émulsion sèche, ont donné la possibilité de distinguer une localisation nucléaire d'une localisation cytoplasmique dans le tissu cérébral et utérin; ils ont aussi permis de déterminer la radioactivité dans les canalicules du système biliaire du foie, et l'espace extracellulaire dans le tissu nerveux. La technique a été employée pour étudier la localisation cellulaire des médicaments marqués dans le tissu nerveux, dans le foie, dans l'utérus et dans le muscle cardiaque. La distribution de la méthoxy-inuline- ^3H a été étudiée dans les ganglions supérieurs cervicaux et nodulaires du chat, en suivant de près l'injection artérielle des ganglions. Une haute activité a été trouvée dans des régions de tissu connectif libre, et dans les surfaces extraneuronales des ganglions. Les canalicules et les conduits biliaires du foie ont été déterminés par l'emploi du mésobilirubinogène- ^3H ,

qui est rapidement excrété après injection intraveineuse. On a pu confirmer la localisation cytoplasmatique de la digoxine- ^3H dans le tissu cardiaque, et on a trouvé la localisation cellulaire de l'acétazolamide marqué par ^3H dans le cerveau. On a rendu claire aussi la localisation de l'estradiol ^3H dans les noyaux des cellules utérines et sa localisation nucléaire dans les éléments neuronaux du système nerveux central.

REFERENCES

1. STUMPF, W. E. and ROTH, L. J. — *J. Histochem. and Cytochem.*, **14** : 274 (1966).
2. STUMPF, W. E. and ROTH, L. J. — *J. Histochem. and Cytochem.*, **15** : 243 (1967).
3. BROWN, D. A., ROTH, L. J. and STUMPF, W. E. — The Physiological Society London Meeting, March, 1967 (Abstract).

Autoradiography of soluble substances in electron microscopy.

H. ECKERT (Sandoz SA, Dépt. pharmaceutique, Bâle, Suisse).

Electron microscopic autoradiography as conventionally performed is possible only with substances which form a stable bond with certain structures of tissue and do not dissolve in the dehydrating, fixing or embedding media. The majority of drugs do not fulfil these conditions : one gets displacement of the substance through diffusion within the tissue and an extraction by the embedding medium. The alternative freeze-substitution and freeze-drying do not fulfil the necessary conditions either. All the compounds tested were dissolved at least to some extent by conventional embedding media.

The freeze-sectioning technique we consider as the only applicable way for obtaining autoradiographs of soluble compounds in situ. This method does not present any problems as far as optical microscopy is concerned (see, for example, Stumpf and Roth, *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 274-284, 1966). Ultra-Thin frozen sections for electron microscopy have so far been obtained by Bernhard and Nancy (*J. Microscopie* **3**, 579-588, 1964) using material embedded in gelatin. So far however, we have not become aware in the literature of a method for making ultra-thin frozen sections without embedding media.

We attempted to prepare ultra-thin sections at temperatures of -40°C to -60°C using a Reichert Om-U2-ultramicrotome, but we succeeded in only a few instances in obtaining morphologically good sections suitable for autoradiography. A way to avoid these difficulties seems to us, to elaborate on our method ordinarily used in optical microscopy for the autoradiography of soluble compounds and extend it to the field of electron optics. The procedure is as follows : ordinary slides are coated with nuclear emulsion, ten microns thick frozen sections are placed in red light on the cooled slides in the cryostat, covered with polyethylene and exposed in the pressed state at a temperature of -20°C . Exposure is followed by fixing in a solution of

glutaric aldehyde of pH 5, washing, developing in metol-hydroquinone, fixing with potassium rhodanide, washing, dehydration in alcohol, finally embedding in epoxy resin. Under the phasecontrast microscope it is then possible to select sites from which to make micro-thin sections.

Autoradiographie de substances au microscope électronique.

H. ECKERT (Sandoz SA, Dépt. pharmaceutique, Bâle, Suisse).

L'autoradiographie au microscope électronique, comme elle est couramment effectuée, n'est possible qu'avec des substances qui forment une liaison stable avec certaines structures des tissus et qui ne se dissolvent pas dans les milieux déshydratants, fixants ou d'inclusion.

La plus grande partie des médicaments ne satisfait pas à ces conditions : il se produit un déplacement de la substance par diffusion dans le tissu et une extraction par le milieu d'inclusion. Si l'on alterne substitution à froid et séchage à froid, on ne remplit pas non plus les conditions nécessaires. Tous les composés essayés ont été dissous, en partie au moins, par le milieu d'inclusion habituel.

Nous considérons la technique de coupe à froid comme le seul procédé satisfaisant pour obtenir des autoradiographies de composés solubles in situ.

Cette méthode ne présente aucun problème tant que l'on utilise le microscope optique (voir, par exemple, Stumpf et Roth, *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 274-284, 1966). Des coupes congelées ultra-minces pour la microscopie électronique ont déjà été obtenues par Bernhard et Nancy (*J. Microscopie* **3**, 579-588, 1964) en employant un matériel inclus dans la gélatine. Cependant jusqu'à présent, nous n'avons pas été informés par la littérature d'une méthode qui permette de faire des coupes congelées ultra-minces sans milieu d'inclusion.

Nous avons essayé de préparer des coupes ultra-minces à des températures de -40°C à -60°C en employant un ultramicrotome Reichert Om-U2, mais nous n'avons réussi que dans quelques cas à obtenir des coupes morphologiquement convenables pour l'autoradiographie.

Le moyen d'éviter ces difficultés consiste à modifier notre méthode couramment employée au microscope optique pour l'autoradiographie des composés solubles et de l'étendre au domaine de l'optique électronique.

Le procédé est le suivant : des lames de verre sont couvertes d'une émulsion nucléaire, des coupes congelées d'une épaisseur de 10 microns sont placées en lumière rouge sur les lames refroidies dans le cryostat et couvertes de polyéthylène, puis exposées, serrées par une pince, à une température de -20°C . L'exposition est suivie par une fixation dans une solution d'aldéhyde glutarique de pH 5, par un lavage et par un développement en métol-hydroquinone, par une fixation dans du sulfocyanure de potassium, par un lavage, par une déshydratation dans l'alcool et enfin par une inclusion dans une résine epoxy. Au microscope à contraste de phase, il est alors possible de choisir les endroits dont on veut faire des coupes ultra-minces.

Les possibilités d'application de l'autoradiographie à la microscopie électronique.

H. ROHR et W. CEHLERT (Pathologisches Institut der Universität von Freiburg, Freiburg i. Breisgau, Deutschland).

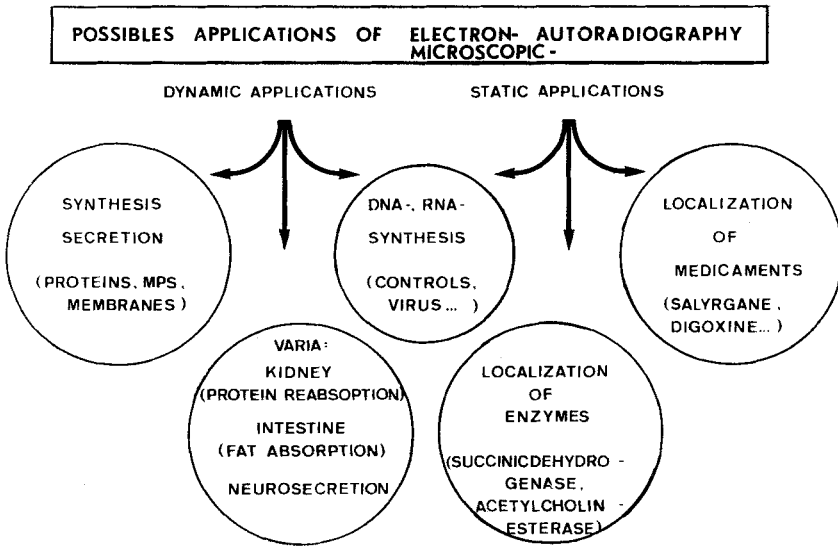
Au cours de l'exposé sur les possibilités d'application de l'autoradiographie à la microscopie électronique nous discuterons tout d'abord des problèmes actuels et les limites de cette méthode. Le principe de l'expérimentation de l'autoradiographie en microscopie électronique au cours de l'analyse sur les processus de synthèse et de sécrétion va être démontré. Le problème principal reste toujours l'obtention d'un mono-layer à grains d'argent sur la coupe ultrafine. Au cours d'une telle expérimentation l'accent doit être mis en particulier sur de nombreux contrôles (^3H -thymidine, « back-ground », autoradiographie par microscope ordinaire, conservation de la structure, etc.). L'analyse des résultats de l'expérimentation principale se divise dans les phases suivantes : 1) figures obtenues par microscope électronique, 2) dénombrement des grains d'argent, 3) détermination de la soi-disant localisation relative spécifique (morphométrie incluse !).

Le déroulement dans le temps de la synthèse intracellulaire après injection de ^3H -leucine sera démontré d'après l'exemple des glandes de Brunner du duodénum. Contrairement à la synthèse des protéines, les premières phases de la synthèse des hydrates de carbone complexes ont lieu dans l'appareil de Golgi. A l'aide de cette méthode, on a pu considérer comme plus étendues les fonctions de la zone de Golgi : synthèse des hydrates de carbone complexes, « Schaltstelle », association de produits de synthèse. L'analyse des résultats semiquantitatifs donne, par exemple pour la glande mammaire, une période de 27 minutes pour les protéines marquées dans le réticulum endoplasmique et une période d'environ 120 minutes dans la zone de Golgi.

D'autres possibilités d'application de la synthèse expérimentale sont données par la détermination de la vitalité de cultures cellulaires, ainsi que par des problèmes posés par la recherche expérimentale sur l'artériosclérose.

La localisation de médicaments, par contre, est plus problématique pour le moment. Nous en discuterons à l'aide de deux exemples : la localisation ultrastructurale du ^{203}Hg -salyrgan, ainsi que celle de la ^3H -digoxine. On peut localiser le ^{203}Hg -salyrgan principalement dans les mitochondries et dans le réticulum endoplasmique lisse, et la ^3H -digoxine principalement dans le réticulum sarcoplasmique et dans les sarcomères (surtout dans la bande Z). On attirera l'attention sur les possibilités d'erreur et sur les limites de l'interprétation de tels résultats.

Une possibilité pleine de promesses est donnée par la localisation d'enzymes, comme par exemple celle de l'acétylcholinesterase, ou celle de la déshydrogénase succinique à l'aide de l'inhibition compétitive au moyen du ^{14}C -malonate. La combinaison de l'autoradiographie avec le séchage à température basse représentera un progrès décisif. A partir de ce moment-là seulement, il sera possible de démontrer l'utilité d'application des substances marquées par des isotopes, solubles dans l'eau.



The possibilities of the use of autoradiography in electron-microscopy.

H. ROHR and W. CEHLERT (Pathologisches Institut der Universität von Freiburg, Freiburg i. Breisgau, Deutschland).

In the course of this discussion of the possibilities of the application of autoradiography to electron-microscopy we will first consider current problems and limitations of this method. The principle of autoradiographic experimentation in electron-microscopy during the analysis of synthetic, and secretory processes will be demonstrated. The major problem remains the production of a monolayer of silver particles on the ultra-fine slice. During such an experiment the accent should be placed on numerous controls (^3H -thymidine, background, autoradiography using an ordinary microscope and conservation of structure, etc.) The analysis of the results of the main experiment is divided into the following stages: (1) obtaining figures from the electron-microscope, (2) counting of silver particles, (3) determination of the so-called specific relative localization (including morphometry).

The time-course of intracellular synthesis following injection of ^3H -leucine will be shown by way of the example of Brunner's duodenal glands. Unlike protein synthesis, the initial stages of complex carbohydrate synthesis occur in the Golgi apparatus. Using this method, the functions of the Golgi-zone may be enlarged: synthesis of complex carbohydrates, « Schaltstelle », association of synthetic products. For example, analysis of the semi-quantitative results obtained from the mammary gland show labelled proteins to spend a period of 27 minutes in the endoplasmic reticulum, and about 120 minutes in the Golgi-zone.

Other possibilities for the application of synthesis experiments are given by the determination of the vitality of cell cultures, and also by the problems of experimental research into arteriosclerosis.

For the moment, however, the localization of drugs remains more problematical. We will consider two examples: The ultrastructural localization of ^{203}Hg -salyrgan, and that of ^3H -digoxin. ^{203}Hg -salyrgan is located mainly in the mitochondria and in the smooth endoplasmic reticulum, whereas ^3H -digoxin is found largely in the sarcoplasmic reticulum and in the sarcomeres (especially in the Z-band). Especial notice will be paid to the possibilities of error and the limitations of interpretation of such results.

A very promising possibility is the localization of fermentation, such as that of acetylcholinesterase or of succinic dehydrogenase, by the use of competitive inhibition with ^{14}C -malonate. The combination of autoradiography with low temperature drying will be a decisive step. Only after this will it be possible to detect water-soluble isotopes without error.

High resolution isotope tracing using induced nuclear reactions.

A. G. MALMON. (National Institute of Health, Bethesda, U. S. A.)

As a means of tracing labelled atoms with resolution comparable to that of the electron microscope, certain induced nuclear reactions whose products cause apparent solid state effects are available. These reactions depend on the use of isotopes which, when exposed to selected radiation sources, react to form products that leave a track which is visible in the electron microscope. This track forms a line, one end of which is at the site of the reaction, and thus serves as a marker denoting the location of the labelling atom. Because the track is formed by direct interaction with the substrate, it is quite narrow, of the order of 100 Angströms or less, and thus offers high resolution. The substrate which will register these tracks may be thin evaporated metal films or plastic films. Except for exposure to radiation, no other chemical or physical processing is necessary, thus preserving the finest details of the specimen image.

The general requirements for the selection of an isotope are that it undergoes readily a specific nuclear reaction and that the reaction products are large enough and energetic enough to register their passage in the appropriate thin film.

Fissionable atoms, such as ^{235}U are particularly applicable to this system. When ^{235}U is incorporated as a label in a biological system, prepared for electron microscopy in a conventional way, and exposed to the high thermal neutron flux of a nuclear reactor, the resultant fission fragments form tracks which are readily visible in the electron microscope. These tracks may be observed in preparations of isolated macromolecules or cell sections.

Other isotopes of pharmacological interest, such as ^6Li , ^{10}B , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O offer possible, but undemonstrated, application of this system. When ^{15}N or ^{18}O are exposed to protons of selected energy, or the other isotopes to

thermal neutrons, there is a relatively high probability that they will disintegrate into an alpha particle and residual nucleus. Either of these products may have enough energy to form a track in a thin film. The tracks would be much smaller than those from fission fragments and thus not as readily visible, but by the same reasoning, would lead to even higher resolution.

Techniques des isotopes traceurs de haute résolution utilisant des réactions nucléaires induites.

A. G. MALMON (National Institute of Health, Bethesda, U. S. A.)

Pour suivre « à la trace » les atomes marqués avec une résolution comparable à celle du microscope électronique, on peut utiliser certaines réactions nucléaires induites, dont les produits ont des effets manifestes d'état solide. Ces réactions dépendent de l'emploi d'isotopes qui, exposés aux sources sélectionnées de radiations, réagissent pour former des produits qui laissent une « trace » visible au microscope électronique. Cette trace forme une ligne, dont une extrémité se trouve au lieu même de la réaction, et sert donc de marqueur indiquant la position de l'atome marqué. Car la trace est formée par une interaction directe avec le substrat; elle est assez étroite, de l'ordre de 100 Å ou inférieure, et permet donc une résolution élevée. Le substrat qui va enregistrer ces traces peut être constitué par des films de métal déposé sous vide ou par des films en plastique. Sauf pour l'exposition à la radiation, aucun autre processus chimique ou physique n'est nécessaire, ce qui préserve ainsi les plus petits détails de l'image de l'échantillon.

Les exigences générales pour la sélection d'un isotope sont qu'il subisse facilement une réaction nucléaire spécifique, et que les produits de cette réaction soient suffisamment importants et puissants pour que leur passage dans le film mince approprié puisse être enregistré.

Des atomes fissibles, tels que ^{235}U sont particulièrement appropriés pour ce système. Lorsque ^{235}U est incorporé en tant qu'agent marquant dans un système biologique, préparé pour le microscope électronique de manière conventionnelle et qu'il est exposé à un flux élevé de neutrons thermiques d'un réacteur nucléaire, les fragments résultant de la fission forment des traces, lesquelles sont facilement visibles au microscope électronique. Ces traces peuvent être observées dans des préparations de macromolécules isolées ou des sections cellulaires.

D'autres isotopes d'intérêt pharmacologique, tels que ^6Li , ^{10}B , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O rendent possible l'application de ce système; mais cette application n'est pas encore démontrée. Lorsque ^{15}N ou ^{18}O sont exposés à des protons d'énergie déterminée, ou les autres isotopes à des neutrons thermiques, il y a une probabilité relativement élevée qu'ils se désintègrent dans une particule α et un noyau résiduel. L'un ou l'autre de ces produits peut avoir suffisamment d'énergie pour former une trace dans un film mince. Les traces seraient beaucoup plus petites que celles dérivées des fragments de fission et par conséquent, moins facilement visibles, mais, par le même raisonnement, conduiraient à une résolution encore plus élevée.

Aspects biochimiques du récepteur spécifique.

G. MILHAUD (Institut Pasteur, Paris, France).

Le concept de récepteur permet une représentation commode du mécanisme des actions pharmacologiques et des processus de synergie et d'antagonisme. Toutefois nos connaissances sur la nature chimique des éventuels récepteurs sont rudimentaires et nous nous proposons d'aborder le problème du récepteur dans deux cas particuliers.

1. *Le récepteur du curare.* Grâce aux curares synthétiques et naturels marqués au carbone 14, Chagas et ses collaborateurs ont montré lors de la curarisation d'*Electrophorus electricus* qu'une partie de la radioactivité est fixée sur des composés macromoléculaires qui peuvent être extraits de l'organe électrique. D'autre part, l'extrait d'organe électrique est capable de lier *in vitro* des curares à fonction ammonium quaternaire; la purification de cet extrait a abouti à l'isolement d'un mucopolysaccharide acide fixant le curare, homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse, auquel on a attribué un rôle de récepteur *in vivo*. Nous avons étudié avec G. Chagas le mode de fixation de curares marqués sur le mucopolysaccharide acide purifié. Le triiodoéthylate de gallamine et la diméthylisochondodendrine se déplacent réciproquement de façon compétitive. Ils peuvent être déplacés, plus ou moins fortement, par d'autres substances à fonction ammonium quaternaire. Il existe une corrélation entre le pouvoir de déplacement mesuré *in vitro* et l'action curarisante *in vivo*. Le mucopolysaccharide acide représente donc un modèle moléculaire permettant d'étudier les interactions qui existent entre un récepteur et des agents renfermant une ou plusieurs fonctions ammonium quaternaire. Bien que l'on ne puisse affirmer que le mucopolysaccharide acide soit le récepteur spécifique du médiateur, c'est à propos du phénomène de curarisation que l'étude moléculaire d'un récepteur a pu être approfondie.

2. *Triamtérène et hématopoïèse.* Les composés antifoliques ont la propriété d'inhiber l'hématopoïèse. La découverte des propriétés diurétiques du Triamtérène, dont la formule chimique est apparentée à celle de certains antifoliques, a conduit à se demander si ce corps possédait ou non une activité déprimant l'hématopoïèse. L'étude des répartitions électroniques a montré que le triamtérène présentait une configuration particulière, différente de celle des antifoliques. D'autre part, les cinétiques de disparition de la radioactivité plasmatique et d'incorporation de radioactivité dans les hématies, après injection intra-veineuse de fer-59, ont établi que le triamtérène était dépourvu chez l'homme de toute activité inhibitrice de l'érythropoïèse. Les rapports entre configurations électroniques et hématopoïèse sont envisagés dans le groupe folique-antifolique. Ces considérations permettent de prévoir l'existence de certains groupements fonctionnels dans la structure du récepteur; leurs implications théoriques et pratiques sont discutées.

Biochemical aspects of the specific receptor.

G. MILHAUD (Institut Pasteur, Paris, France).

The receptor concept permits a convenient representation of the mechanism of pharmacological actions and processes of synergy and antagonism. However, our knowledge concerning the chemical nature of eventual receptors are rudimentary and we propose to consider the receptor in two particular cases.

1. *The curare receptor.* Thanks to synthetic and natural curares labelled with carbon 14, during the curarisation of *Electrophorus electricus*, Chagas and his collaborators have shown that part of the radioactivity is fixed on macromolecular compounds, which can be extracted from the electric organ. On the other hand, the electric organ extract is able to bind *in vitro* curares with quaternary ammonium function; the purification of this extract lead to the isolation of an acid mucopolysaccharide binding the curare, homogeneous at ultracentrifugation and electrophoresis, which was attributed a role of receptor *in vivo*. We have studied with C. Chagas the mode of fixation of labelled curares by purified acid mucopolysaccharide. Gallamine triiodoethylate and dimethylisochondodendrine displace each other in a competitive fashion. They may be displaced more or less efficiently, by other compounds with quaternary ammonium function. There exists a correlation between the displacing power measured *in vitro* and the curarising action *in vivo*. Acid mucopolysaccharide represents therefore a molecular model making it possible to study the interactions between a receptor and compounds with one or several quaternary ammonium functions. Although it cannot be stated that the acid mucopolysaccharide is the specific receptor of the mediator, the curarisation phenomenon has enabled to undertake a detailed molecular study of a receptor.

2. *Triamterene and hematopoiesis.* Antifolic compounds have able to inhibit hematopoiesis. The discovery of the diuretic properties of Triamterene, the chemical formula of which is related to that of certain antifolic drugs, has led to the question of whether or not this compound would depress hematopoiesis. The study of the electronic repartition has shown that triamterene has a particular configuration, different from that of the antifolic compounds. On the other hand, the kinetics of the disappearance of plasma radioactivity, after intravenous injection of iron 59, have established that triamterene does not affect erythropoiesis in man. The relationship between electronic configuration and hematopoiesis are discussed in the group folic-antifolic compounds. These considerations should lead to predict the existence of functional groups in the receptors.

On the detection of specific receptors ; primary sites of action.

H. VELDSTRA (Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit, Leiden, Nederland).

The ultimate goal of fundamental pharmacological research is to be informed in detail about the interaction of a pharmacologically or physiologically active compound with its specific receptor, resulting in a characteristic response.

One of the prerequisites for attaining that aim is to locate the respective primary site of action at the (macro)molecular level.

Until now this mostly has been tried by tracing the labelled agent in the responsive tissue, using autoradiography. Though in some favourable cases a rather selective localization in certain regions of receptor carrying tissues has been observed, a resolution down to the desired level was not attained.

In this respect, these methods, operating exclusively with the active compound, generally will fail on principle, because of the fact that at the active concentration of the compound part of the occupied sites only is responsible for the specific effect. The primary sites of action cannot be distinguished in this way from the sites of loss ⁽¹⁾, where the compound may be adsorbed aspecifically, be decomposed (on an enzym surface) etc. (cf. also the discussion on definition of receptors in ⁽²⁾). A number of synergists for different effective agents most probably acts by occupying these sites of loss (cf. ⁽¹⁾).

In combination with such a synergist, a concentration of the active agent, too low to be active by itself while not or not sufficiently interacting with the responding receptor, may become active even up to the optimal level as it then reaches the site of action to the required degree.

It was considered whether in principle with comparative autoradiography of the distributions of the labelled agent at an inactive concentration and of same (becoming active) in combination with an unlabelled synergist, a shift towards the active sites might be observed.

With an introduction on comparable techniques in the detection of active sites on enzymes surfaces, the implications of such a method, being investigated for plant growth substances (auxins), more or less as a model, will be discussed.

A critical survey of other approximations, applied in this field, will be given.

BIBLIOGRAPHY

1. VELDSTRA, H. — On synergism and potentiation, with special reference to combinations of structural analogues. *Pharmacol. Revs.*, **8** : 339 (1956).
VELDSTRA, E. — *Synergism of Drugs*. Proc. IIIrd. Int. Congress Chemotherapy. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, p. 42.
2. *Enzymes and Drug action*. CIBA symposium. Churchill Ltd., London, 1962, p. 439.

Sur la découverte de récepteurs spécifiques ; lieux d'action primaires.

H. VELDSTRA (Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit, Leiden, Nederland).

Le but ultime de la recherche pharmacologique fondamentale est de s'informer en détail sur l'interaction entre une molécule pharmacologiquement ou physiologiquement active et son récepteur spécifique, ce qui aboutit à une réponse caractéristique.

Une des nécessités préalables pour atteindre ce but est de repérer le lieu d'action primaire correspondant au niveau (macro)moléculaire.

Jusqu'à présent, ceci a été essayé en utilisant l'agent marqué par un isotope radioactif dans le tissu sensible, en employant l'autoradiographie. Bien que dans quelques cas favorables une localisation assez sélective dans certaines régions des tissus récepteurs-porteurs ait été observée, une conclusion touchant le niveau désiré n'a pas été obtenue.

A cet égard, ces méthodes — qui opèrent exclusivement sur la molécule active — échouent généralement en principe, en raison du fait qu'à la concentration active du composé, seule une partie du lieu d'action occupé est responsable de l'effet spécifique. Les lieux primaires d'action ne peuvent pas être distingués de cette manière des lieux de perte ⁽¹⁾, où le composé peut être absorbé de façon non spécifique, être décomposé (sur une surface enzymatique) etc. (voir aussi la discussion sur la définition des récepteurs dans ⁽²⁾). Un certain nombre de substances synergiques pour différents agents peut probablement agir en occupant ces lieux de perte (cf. ⁽¹⁾).

En se combinant avec une telle substance synergique, une concentration de l'agent actif trop basse pour être active elle-même tout en n'exerçant pas d'interaction ou en exerçant une interaction insuffisante sur le récepteur sensible peut devenir active même à un degré optimal puisqu'elle atteint le lieu d'action à un degré nécessaire.

Il a été considéré si en principe avec l'autoradiographie comparative des distributions de l'agent marqué à une concentration inactive et de ce même agent (devenu actif) en combinaison avec une substance synergique non marquée, on doit pouvoir observer un déplacement vers les lieux actifs.

Après avoir comparé, dans l'introduction, les techniques utilisées dans la découverte des emplacements actifs sur des surfaces enzymatiques, les implications d'une telle méthode qu'on est en train de rechercher pour des substances de croissance végétale (auxines) plus ou moins comme modèle, seront discutées.

Un examen critique d'autres approximations appliquées dans ce domaine sera donné.

1. VELDSTRA, H. — Sur le synergisme et la potentialisation, avec une référence spéciale aux combinaisons d'analogues structurales. *Pharmacol. Revs.*, 8 : 339 (1956).
VELDSTRA, H. — *Synergisme des médicaments*. Proc. III^e Congrès International de Chimiothérapie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, p. 42.
2. *Enzymes et action des médicaments*. Symposium CIBA. Churchill Ltd., London, 1962, p. 439.

Tissue localization in relation to action.

S. ULLBERG and L. HAMMARSTRÖM (Royal Veterinary College, Dept. of Pharmacology, Stockholm, Sweden).

When the distribution of drugs and other substances of pharmacological interest is studied by autoradiography, a selective accumulation in some tissues is generally found. This accumulation can often be related to the action of the substance.

Distribution studies of drugs therefore can help to clarify their mode of action, and may also lead to the discovery of drug effects which have not previously been observed.

In addition to the accumulation of drugs, which can be related to action, there is also for most drugs an excretion pattern. Sometimes, but not always, a retention in the site of action can be seen when most of the drug has been excreted.

The drug pattern sometimes resembles that of a physiological substance or its precursor, which will be exemplified for biogenic amines and steroid hormones.

Biogenic amines : The sites of synthesis and storage of catecholamines and indolamines have been studied by autoradiography of their labelled precursors (dopa, 5-HTP). Autoradiography has been combined with fluorescence microscopy of the amines.

Accumulation of serotonin has in this way been found in endocrine organs, such as the pancreatic islets, thyroid, parathyroid and pituitary, indicating a possible role of serotonin in the control of hormonal release.

In the islets serotonin is found in the beta cells and catecholamines in the alpha cells, which seems interesting considering the dualistic role of insulin and glucagon in blood sugar regulation.

Many "drugs" show similar localization as the biogenic amine precursors and their actions or side effects may be explained as an interference with the endogenic amines.

Steroid hormones : Natural estrogens are localized in target organs and synthetic estrogens show a very similar pattern.

Sites of synthesis of steroid hormone can be localized by autoradiography of steroid hormone precursors (e.g. cholesterol and pregnenolone). A synthetic substance has been found to localize as a progesterone precursor and to interfere with its production.

Localisation dans le tissu en relation avec l'action.

S. ULLBERG et L. HAMMARSTRÖM (Royal Veterinary College, Dept. of Pharmacology, Stockholm, Suède).

Lorsque la distribution des médicaments et d'autres substances d'intérêt pharmacologique est étudiée par autoradiographie, on trouve généralement une accumulation sélective dans quelques tissus. Cette accumulation peut souvent être en relation avec l'action de cette substance.

Les études sur la distribution des médicaments peuvent donc aider à expliquer leur mode d'action, et pourront aussi mener à la découverte d'effets de médicaments qui n'ont pas été observés jusqu'ici.

En plus de l'accumulation des médicaments, qui peut être en relation avec l'action, il y a aussi, pour la plupart des médicaments, un rythme d'excrétion. Quelquefois — mais pas toujours — on peut observer une rétention au lieu d'action lorsque la plus grande partie du médicament a été excrétée.

Ce rythme d'excrétion du médicament ressemble parfois à celui d'une substance physiologique ou de son précurseur, comme, par exemple, pour les amines biogènes et les hormones stéroïdiques.

Amines biogènes : Les lieux de synthèse et de stockage des catécholamines et des indolamines ont été étudiés par autoradiographie de leurs précurseurs marqués (dopa, 5-HTP). L'autoradiographie a été combinée avec la microscopie en fluorescence des amines.

L'accumulation de sérotonine a ainsi été découverte dans les organes endocriniens, tels que les îlots pancréatiques, la thyroïde, la parathyroïde et la glande pituitaire, ce qui indique un rôle possible de la sérotonine dans le contrôle de la libération des hormones.

Dans les îlots, la sérotonine se trouve dans les cellules bêta, et les catécholamines dans les cellules alpha, ce qui nous paraît intéressant si l'on considère le rôle respectif de l'insuline et du glucagon dans la régulation du sucre sanguin.

Plusieurs « médicaments » présentent une localisation semblable à celle des précurseurs (marqués) des amines biogènes et leurs actions ou réactions secondaires peuvent s'expliquer comme une interférence avec les amines endogènes.

Hormones stéroïdiques : Les œstrogènes naturels sont localisés dans les organes sélectifs et les œstrogènes synthétiques présentent des voies très similaires.

Les lieux de synthèse des hormones stéroïdiques peuvent être localisés par autoradiographie de leurs précurseurs (par exemple, le cholestérol et la prégnenolone). Une substance synthétique a été découverte capable de localiser un précurseur de la progestérone, et d'intervenir dans sa production.

The use of ^3H -noradrenaline in studying adrenergic mechanisms.

J. AXELROD (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland 20014, U. S. A.).

The introduction of labelled catecholamines of high specific activity made possible considerable advances in our knowledge concerning the metabolism, storage, and release of noradrenaline and other catecholamines. After the administration of ^3H -noradrenaline to animals it is selectively taken up by storage vesicles in sympathetic nerves. The labelling of the ^3H -noradrenaline stores in the sympathetic nerves made it possible to study the uptake, release and metabolism of the neurotransmitter and the effect of adrenergic drugs.

When ^3H -noradrenaline is taken up from the circulation, it crosses the axonal membrane of sympathetic nerves into the cytoplasm and it is stored in dense core vesicles within the nerves. Upon release from sympathetic nerves the ^3H -noradrenaline is inactivated by several processes including removal by the circulation, enzymatic transformation mainly by catechol-O-methyl-transferase and reuptake into the sympathetic nerves. Many adrenergic drugs interfere with the uptake, storage, and release of noradrenaline. Cocaine and imipramine block uptake of ^3H -noradrenaline across the neuronal membrane; sympathomimetic amines release ^3H -noradrenaline from the storage vesicles; reserpine prevents storage of ^3H -noradrenaline in the nerve granules; and ganglionic blocking agents slow the release of ^3H -noradrenaline. ^3H -noradrenaline can also be taken up into extraneural stores. This extraneural uptake of ^3H -noradrenaline is inhibited by adrenergic blocking agents and normetanephrine, the O-methylated metabolites of noradrenaline. Central adrenergic stores can be labelled with ^3H -noradrenaline by introducing the radioactive amine into the lateral ventricle of the brain. Drugs also affect the uptake, storage, release, and metabolism of brain ^3H -noradrenaline in the same manner as in the peripheral nervous system. The use of radioactive S-adenosyl-methionine has proven to be valuable in the study of the enzymes involved in the metabolism of noradrenaline.

L'emploi de la ^3H -noradrénaline dans l'étude des mécanismes adrénérgiques.

J. AXELROD (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland 20014, U. S. A.).

L'introduction des catécholamines marquées de haute activité spécifique a permis de considérables progrès dans nos connaissances touchant le métabolisme, la mise en réserve et la libération de la noradrénaline et d'autres catécholamines. Après l'administration de ^3H -noradrénaline à des animaux, elle est captée sélectivement par des vésicules de stockage dans les nerfs sympathiques. Le marquage des réserves de ^3H -noradrénaline dans les nerfs sympathiques permet l'étude de la captation, de la libération et du métabolisme du neurotransmetteur ainsi que l'étude des médicaments adrénérgiques. Lorsque la ^3H -noradrénaline est enlevée de la circulation, elle traverse la membrane de l'axone des nerfs sympathiques pour gagner le cytoplasme et elle est stockée dans des vésicules de forte densité dans les nerfs. Lors de la libération des nerfs sympathiques, la ^3H -noradrénaline est inactivée par plusieurs processus, y compris son enlèvement par la circulation, sa transformation enzymatique principalement par la catechol-O-méthyltransferase et sa recaptation par les terminaisons nerveuses sympathiques.

Beaucoup de médicaments adrénérgiques interviennent dans la captation, la mise en réserve et la libération de la noradrénaline. La cocaïne et l'imipramine bloquent la captation de ^3H -noradrénaline à travers la membrane neuronale; les amines sympathicomimétiques libèrent la ^3H -noradrénaline des vésicules de réserve; la reserpine empêche la mise en réserve de la ^3H -noradrénaline dans les granules des nerfs; et des agents de blocage ganglion-

naire ralentissent la libération de la ^3H -noradrénaline. La ^3H -noradrénaline peut aussi être stockée dans les réserves extraneurales. Cette prise extraneurale de ^3H -noradrénaline est inhibée par des agents de stockage adrénergique et par la normétanéphrine, le métabolite O-méthylé de la noradrénaline. Les réserves centrales adrénergiques peuvent être marquées avec de la ^3H -noradrénaline en introduisant l'amine radioactive dans le ventricule latéral du cerveau.

Des médicaments modifient aussi la captation, la mise en réserve, la libération et le métabolisme de la ^3H -noradrénaline du cerveau de la même manière qu'au niveau du système nerveux périphérique. L'emploi de la S-adénosyl-méthionine radioactive s'est montré valable dans l'étude des enzymes impliqués dans le métabolisme de la noradrénaline.

Isotopes in the central nervous system.

H. DAVSON (Department of Physiology, University College, London).

Isotopes have revolutionized the study of the exchange of materials between blood, cerebrospinal fluid and brain tissue, and in the present communication a few instances will be given. The concept of a blood-brain barrier derives from relatively crude studies using dye-stuffs, and implies the presence of a measurable extra-cellular space. The existence of this space has been questioned and it will be shown how, by kinetic studies employing ^{14}C -labelled isotopes, the space may be demonstrated and that the concept of a blood-brain barrier is valid. The barrier may be disturbed pathologically, especially in regions of tumour growth, and in this case the relatively free passage of isotopically labelled substances permits the localization of a tumour. Finally the problem as to whether the cerebrospinal fluid circulates, and the direction of the currents of flow, may be investigated by using isotopically labelled materials.

Les isotopes dans le système nerveux central.

H. DAVSON (Department of Physiology, University College, London).

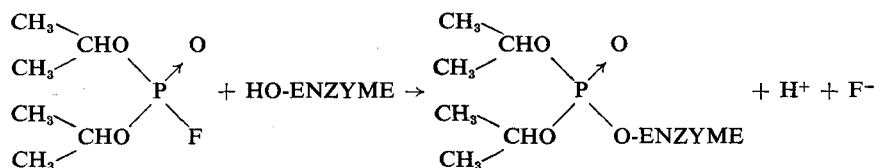
Les isotopes ont révolutionné l'étude de l'échange des matériaux entre le sang, le liquide cérébrospinal et le tissu du cerveau, et dans la présente communication nous en donnerons quelques exemples. L'idée d'une barrière sang-cerveau dérive d'études relativement sommaires en employant du matériel colorant, et implique la présence d'un espace extra-cellulaire mesurable. L'existence de cet espace a été contestée, et on montrera comment il peut être démontré par des études cinétiques au moyen d'isotopes marqués par ^{14}C , et que l'idée d'une barrière sang-cerveau est valable. Le fonctionnement de la barrière peut être troublé par des facteurs pathologiques, surtout dans les

régions où s'accroissent les tumeurs; dans ce cas, le passage relativement libre des substances marquées isotopiquement permet la localisation d'une tumeur. Enfin, à l'aide des traceurs radioactifs, on peut examiner la question de savoir si le fluide cérébrospinal circule, et le sens des courants du flux.

Autoradiographie des plaques motrices de souris avec le DFP.

J. RELLER et P. G. WASER (Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz).

Les esters organiques de l'acide phosphorique bloquent une grande partie de ferments, c'est-à-dire les estérases-B, par une phosphorylation irréversible d'un groupe hydroxylique activé par un reste de sérine qui fait partie du centre estérasique de ces enzymes :



Cette réaction permet de marquer la cholinestérase concentrée dans les plaques motrices avec le DFP radioactif et d'en faire une reproduction autoradiographique. Au moyen de méthodes histochimiques, la cholinestérase peut être localisée avec plus de précision que par les moyens de l'autoradiographie. Pour cette raison, nous avons concentré nos efforts sur l'exploitation quantitative de nos autoradiographies, essayant de mesurer à l'aide d'un densitomètre le nombre des molécules de DFP fixées par les plaques motrices et d'en déterminer le nombre total des centres actifs de la cholinestérase. Pour cela, les autoradiographies que nous avons obtenues des diaphragmes incubés dans différentes solutions de DFP-³²P nous ont donné les meilleurs résultats.

Si on augmente la concentration du DFP dans la solution d'incubation, les plaques motrices absorbent de plus en plus de molécules de DFP, puis, à une concentration de 10⁻⁵ m la saturation s'établit. Ce sont alors à peu près 2,2 · 10⁷ molécules de DFP qui sont fixées par une plaque motrice.

Le parallélisme étroit, qui existe entre l'effet d'inhibition du DFP sur la cholinestérase et le nombre des molécules de DFP qui sont fixées par les plaques motrices permet d'admettre que la fixation élevée de DFP dans les plaques motrices comparée à celle des fibres musculaires est principalement due à la cholinestérase.

Cette hypothèse se trouve confirmée par l'effet que les inhibiteurs de la cholinestérase exercent sur les autoradiographies; notamment une pré-incubation des diaphragmes dans la physostigmine de 10⁻⁵ m (concentration

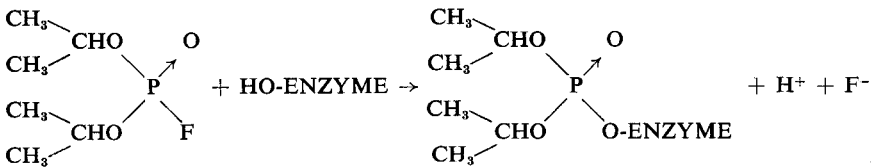
généralement appliquée pour distinguer la cholinestérase et les estérases non spécifiques) donne des autoradiographies négatives.

Par conséquent, nous pouvons admettre que le nombre de $2,2 \cdot 10^7$ représente la quantité des centres actifs de la cholinestérase dans une plaque motrice du diaphragme de souris.

Autoradiography of motor endplates with DFP in the mouse.

J. RELLER and P. G. WASER (Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz).

Organic esters of phosphoric acid block a large number of enzymes, that is the esterases-B, by an irreversible phosphorylation of a hydroxylic group, activated by a serine residue which forms a part of the hydrolytic centre of these enzymes :



This reaction makes it possible to label cholinesterase concentration in the motor endplates with radioactive DFP and to make an autoradiographic reproduction. By histochemical methods, cholinesterase can be localized with greater precision than by autoradiography. For this reason, we have concentrated on the quantitative analysis of our autoradiographies, attempting to measure, with the aid of a densitometre, the number of DFP molecules fixed by the motor endplates and to determine the total number of active centres of cholinesterase. Autoradiographies which we have obtained from diaphragms incubated in different solutions of DFP- ^{32}P have given the most favourable results.

If one increases the concentration of DFP in the incubating medium, the motor endplates absorb more and more DFP molecules and then, at a concentration of 10^{-5} saturation is reached. Thus approximately $2,2 \cdot 10^7$ molecules of DFP are fixed by a motor endplate.

The strong parallelism which exists between the inhibition of DFP on cholinesterase and the number of DFP molecules which are fixed by the motor endplates makes it possible to state that the high fixation of DFP in the motor endplates compared to that of muscle fibres is mainly due to cholinesterase.

This hypothesis is confirmed by the effect which the inhibitors of cholinesterase display on autoradiographies; particularly a pre-incubation of the diaphragms in physostigmine $10^{-5} m$ (the concentration generally applied

to distinguish cholinesterases and non specific esterases) gives negative autoradiographies.

Consequently, we can conclude that the number of $2.2 \cdot 10^7$ represents the quantity of the active centres of the cholinesterase in a motor endplate of the mouse diaphragm.

Drug induced selective accumulation of labelled sterols in mammalian tissues.

R. PAOLETTI, R. FUMAGALLI, G. GALLI and E. GROSSI-PAOLETTI (Institute of Pharmacology, University of Milan, 20129 Milan, Italy).

A quantitative procedure for the extraction, purification and analysis of sterols present in biological tissues has been recently developed in our laboratory.

This approach is based on the quantitative chromatographic separation of sterols on silica gel G-celite columns impregnated with silver nitrate. The single sterols (in form of sterol acetates) are quantitated using gas chromatography and further identified against standards on a combination of gas chromatography and mass spectrometry. This procedure gives quantitative recoveries of components representing 0.1-1.0% of the total sterol fraction even in the presence of a large excess of a single sterol (cholesterol).

This method brings to light the possibility of inducing an accumulation of specific sterols in biological tissues and producing in this way sterols which would be very difficult to obtain by using the conventional radiochemical techniques. Experiments along these lines are presented. Triparanol, a specific inhibitor of the Δ 24-25 reductase, has been used. Adult (300 g) Sprague Dawley rats are treated for seven days with 25 mg/kg daily of Triparanol (*1p*-(β diethyl-amino-ethoxy)phenyl) *1-(p*-tolyl) *2-(p*-chlorophenyl) ethanol dissolved in oil and given intraperitoneally. One hour before sacrifice the animals received intravenously $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mevalonate (250 microC/kg).

The tissues to be analysed for sterols are removed, saponified in ethanolic KOH, the unsaponifiable extracted and the sterols separated using our quantitative procedure. The results in liver and brain indicate the accumulation of highly labelled sterol precursors of cholesterol with 29, 28 and 27 carbon atoms and double bonds in positions 7-24, 8-24, 5-24, which are readily separated.

These findings underline the opportunity of obtaining unusual labelled sterols using the biosynthetic approach. On the other hand the possibility is now open to follow the biosynthetic routes of cholesterol and steroid hormones in different tissues and under various experimental conditions and to assay on a comparative basis the quantitative importance of each of the several pathways leading to cholesterol and steroid biosyntheses which are now only postulated.

Accumulation sélective des stérols marqués provoquée par le médicament dans les tissus des glandes mammaires.

R. PAOLETTI, R. FUMAGALLI, G. GALLI et E. GROSSI-PAOLETTI (Institute of Pharmacology, University of Milan, 20129 Milan, Italy).

Un procédé quantitatif pour l'extraction, la purification et l'analyse des stérols présents dans les tissus biologiques a été développé récemment dans notre laboratoire.

Cette méthode est basée sur la séparation quantitative par chromatographie des stérols sur des colonnes de gel de silice G-celite imprégnées de nitrate d'argent. Chaque stérol séparément (sous forme d'acétate de stérol) est déterminé quantitativement en employant la chromatographie en phase gazeuse et puis identifié sur des standards par une combinaison de chromatographie en phase gazeuse et de spectrométrie de masse. Ce procédé donne des quantités de composants représentant 0,1-1,0% de la fraction totale des stérols même en présence d'un fort excès d'un seul stérol (cholestérol).

Cette méthode met en lumière la possibilité de provoquer une accumulation de stérols spécifiques dans les tissus biologiques et de produire de cette façon des stérols qui seraient très difficiles à obtenir en employant les techniques radiochimiques conventionnelles.

Des expériences sont présentées dans ce rapport. On a employé du Triparanol, inhibiteur spécifique de la réductase Δ 24-25. On traite des rats adultes (300 g) Sprague Dawley pendant 7 jours avec 25 mg/kg par jour de Triparanol (1*p*- (β diéthyl-amino-ethoxy) phényl) 1-(*p*-tolyl) 2-(*p*-chlorophényl) éthanol dissous dans de l'huile et administré par voie intra-péritonéale. Une heure avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent par voie intraveineuse du mevalonate 2-¹⁴C (250 microC/kg).

Les tissus que l'on doit analyser pour les stérols sont prélevés, saponifiés dans de la KOH éthanolique; la partie non saponifiée est extraite et les stérols séparés selon notre procédé quantitatif. Les résultats obtenus pour le foie et le cerveau indiquent l'accumulation de stérols hautement marqués, précurseurs du cholestérol avec 29, 28 et 27 atomes de carbone et avec des doubles liaisons en position 7-24, 8-24, 5-24 qui sont facilement séparés. Ces découvertes soulignent la possibilité d'obtenir des stérols marqués inhabituels en employant la méthode bio-synthétique. D'autre part, il y a maintenant possibilité de suivre les voies biosynthétiques du cholestérol et des hormones stéroïdes dans différents tissus et dans des conditions expérimentales variées et d'étudier sur une base comparative l'importance quantitative de chacun de ces nombreux parcours menant à la biosynthèse du cholestérol et des stéroïdes qui ne sont pour le moment pas démontrés.

Intermediary metabolism of phospholipids in nervous tissues as studied with quantitative microenzymatic methods.

R. E. MCCAMAN (Indiana University, Institute of Psychiatric Research, Indiana, U.S.A.).

One of the unique characteristics of brain as a tissue is its high content of lipid material which in some areas may account for as much as 70% of the dry weight. Most of this lipid is phospholipid composed primarily of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, and sphingomyelin. Shortly after birth a permeability "barrier" restricts passage of all but a few substances into brain tissue. Since most of the phospholipid appears at a later period, it may be assumed that nervous tissue contains the appropriate biosynthetic enzymes to produce the characteristic phospholipids.

If a study of phospholipid metabolism is to be correlated with histologically distinct subdivisions of nervous tissue, the analytic techniques to be used must be extremely sensitive since the quantities of tissue available by these criteria amount to only a few micrograms and the amount of enzymatic product produced by such a sample would be of the order of 10^{-10} - 10^{-12} moles. The analytic technique which I wish to discuss is one which utilizes isotopes. Although such techniques have frequently been used in the past for demonstrations of a metabolic pathway qualitatively, it may not be generally appreciated that isotopic techniques may be used as a basis for extremely sensitive quantitative assays of single step enzyme catalyzed reactions. Their intrinsic sensitivity is equal to or greater than that of other procedures (i.e. fluorescence, absorption, titration) currently used for biochemical studies and in some cases (notably phospholipid metabolism), they may represent the only way a reliable and convenient chemical measure of an enzyme activity or tissue constituent may be obtained. Furthermore, the conditions of an isotopic procedure may usually be manipulated so that the consequences of secondary metabolic reactions are negligible. A particular advantage of these techniques is the ease with which they may be used to study the effects of antimetabolites or inhibitors of enzyme activity.

The enzymes to be discussed in some detail will be concerned with (a) the biosynthesis of phosphatidic acid from acyl CoA and α -glycerolphosphate; (b) the utilization of phosphatidic acid for the biosynthesis of the glycerophosphatides containing choline and ethanolamine; and (c) the utilization of phosphatidic acid for biosynthesis of CDP diglyceride. The latter serves as an essential intermediate in the formation of glycerophosphatides containing inositol, glycerol and serine. These enzymes have been studied with respect to optimal substrate concentrations, pH and the effects of salts, detergents, and various pharmacologic agents on their *in vitro* activity. Their distribution within various histologically discrete structures and their association with specific subcellular fractions has been assessed. The activities of these enzymes have been measured in nervous tissues undergoing maturational and pathologic changes and in animals on various dietary regimes.

It may be summarily stated that all the enzymes thus far studied exhibit

the following general properties : (a) they exhibit a greater activity in tissues rich in neuronal soma (gray matter) and are relatively less active in white matter or areas where myelin is prominent; (b) there is substantially no difference in the relative activities of nerve tracts containing glial vs. Schwann cell elements; (c) there is an enhanced activity during the early postnatal period corresponding roughly to the period of myelination (15-25 days in the rabbit) with a subsequent decline in measurable activity in the adult; (d) there appears to be a markedly enhanced activity in peripheral nerves and central white tracts undergoing secondary degeneration (demyelination); (e) with the exception of phosphatidic acid cytidyl transferase, they are primarily associated with particulate material in the microsomal fraction of brain and other tissues; (f) the activities of these enzymes in brain or other tissues exhibit little to no change under conditions of dietary alterations (starvation, fat-free refeeding) that markedly affect fatty acid biosynthesis; and (g) they are largely unaffected *in vitro* by various pharmacologic agents known to affect central nervous system functions.

Le métabolisme intermédiaire des phospholipides dans les tissus nerveux étudié avec des méthodes microenzymatiques quantitatives.

R. E. MCCAMAN (Indiana University, Institute of Psychiatric Research, Indiana, U.S.A.).

On L'une des caractéristiques uniques du cerveau en tant que tissu est sa teneur élevée en matériel lipidique qui peut atteindre dans quelques zones jusqu'à 70% du poids sec. La plus grande partie de ces lipides est constituée par un phospholipide composé premièrement des phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidyllinositol et sphingo-myéline. Peu de temps après la naissance, une barrière perméable restreint le passage de toutes les substances à part quelques-unes dans le tissu cérébral. Puisque la plupart des phospholipides apparaissent à un moment ultérieur, il peut être présumé que le tissu nerveux contient les enzymes biosynthétiques appropriées pour produire les phospholipides caractéristiques.

Si une étude du métabolisme des phospholipides doit être en corrélation avec des subdivisions histologiquement distinctes du tissu nerveux, les techniques analytiques qui doivent être employées, doivent être extrêmement sensibles puisque les quantités de tissu disponible par ces critères ne se montent qu'à quelques microgrammes et que la quantité du produit enzymatique formé par un échantillon serait de l'ordre de 10^{10} - 10^{12} mol.

La technique analytique que je désire discuter est une technique dans laquelle on emploie les isotopes. Bien que de telles techniques aient été fréquemment employées par le passé pour des démonstrations d'un parcours métabolique d'un point de vue qualitatif, on n'estime pas de façon générale que les techniques isotopiques peuvent être employées comme bases de dosages quantitatifs extrêmement sensibles pour des réactions d'une seule étape de catalyse enzymatique. Leur sensibilité intrinsèque est égale ou supérieure à celle d'autres procédés (par exemple : fluorescence, absorption, titration)

couramment employés lors d'études biochimiques; et dans quelques cas (en particulier dans le métabolisme des phospholipides) elles représentent le seul moyen d'obtenir une mesure sûre et chimiquement convenable d'une activité enzymatique ou d'un constituant de tissu.

En outre, les conditions d'un procédé utilisant des isotopes peuvent être généralement réalisées de sorte que les conséquences de réactions métaboliques secondaires soient négligeables. Un avantage particulier de ces techniques est la facilité avec laquelle elles peuvent être employées pour étudier les effets des antimétaboliques ou des inhibiteurs de l'activité enzymatique.

Les enzymes à exposer en détail concernant *a*) la biosynthèse de l'acide phosphatidique par l'acyl CoA et l' α -glycérolphosphate; *b*) l'utilisation de l'acide phosphatidique pour la biosynthèse des glycérophosphatides contenant de la choline et de l'éthanolamine; et *c*) l'utilisation de l'acide phosphatidique pour la biosynthèse du CDP diglycéride. Ce dernier sert d'intermédiaire essentiel dans la formation de glycérophosphatides contenant de l'inositol, du glycérol et de la sérine. Ces enzymes ont été étudiées par rapport aux meilleures concentrations du substratum, le pH et les effets de sels, détergents et d'agents divers pharmacologiques sur leur activité *in vitro*. On a mesuré leur distribution dans les différentes structures histologiquement appropriées et leur association avec des fractions subcellulaires spécifiques. On a mesuré les activités de ces enzymes dans des tissus nerveux subissant des changements pathologiques et maturationnels et chez des animaux soumis à des régimes diététiques variés. Il peut être établi en résumé que toutes les enzymes ainsi étudiées se montrent douées des propriétés générales suivantes : *a*) elles montrent une activité plus grande dans les tissus riches en soma neuronal (matière grise) et sont relativement moins actives dans la matière blanche ou dans les zones où la myéline est prédominante; *b*) il n'y a matériellement aucune différence dans les activités relatives de faisceaux nerveux contenant du glial, c'est-à-dire des éléments cellulaires de Schwann; *c*) il y a une activité accrue pendant la première période postnatale correspondant à peu près à la période de myélinisation (15-25 jours chez le lapin) avec une baisse subséquente dans l'activité mesurable chez l'adulte; *d*) il semble qu'il y a une activité nettement accrue dans les nerfs périphériques et dans les faisceaux centraux blancs, subissant une dégénération secondaire (démýélinisation); *e*) à l'exception de la cytidyl transférase de l'acide phosphatidique, elles sont principalement associées à des matériaux particuliers dans la fraction microsomale du cerveau et d'autres tissus; *f*) les activités de ces enzymes dans le cerveau ou dans les autres tissus montrent peu ou pas de changement sous des conditions de changement de régime alimentaire (privations, reprise de nourriture sans graisse) qui affectent très fort la biosynthèse des acides gras; et *g*) elles ne sont pas, pour une part, attaquées *in vitro* par différents agents pharmacologiques connus pour attaquer les fonctions du système nerveux central.

Kinetic isotope effects in metabolic studies with deuterated and tritiated compounds.

H. AEBI (Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern, Schweiz).

The use of an isotope as a tracer is based on the assumption that the small minority of labelled molecules is distributed and metabolized in the organism exactly the same way as the moiety of non-labelled molecules. In order to meet this requirement two conditions have to be fulfilled : (1) The isotope serving as a label has to be attached *firmly* to the molecule, so that any loss due to isotopic exchange is excluded. (2) No *discrimination* must occur among the various molecular species, i.e. the compound has to be labelled in such a way, that the tagged and the other molecules are indistinguishable for the organism. The former condition is a matter of proper choice of the atom serving as a label, in regard with its chemical nature and its position within the molecule. The latter depends on the extent to which physical, chemical and biological properties of the molecule are altered by the introduction of an isotopic atom to be used as a tracer.

Differences in reaction rates — called kinetic isotope effects — have to be expected mainly if the mass of the isotopic atom, used for labelling, differs considerably from that of the abundant species of the same element. Therefore they are most pronounced among the hydrogen isotopes i.e. protium (^1H), deuterium (^2H or D) and tritium (^3H or T). In addition the magnitude of an isotope effect depends on the type of chemical reaction and the period of time for which the isotope selection is effective. As a rule reaction rates are less affected than equilibria. If the locus of the isotopic substitution is directly involved in the bond breaking or the bond forming of the reaction, this is called a *primary* isotope effect; if it is not involved, it is called a *secondary* (or distant) isotope effect. Usually the former are bigger than the latter.

Owing to the frequent use of ^3H and ^2H as a label in biochemistry and pharmacology isotope effects among these species are of practical importance. Deuterium, mainly in form of its oxide, is available since 1932, when Urey *et al.* succeeded in concentrating heavy water by electrolysis or distillation. Classical experiments using deuterium as a label have been performed in this country already three decades ago by Erlenmeyer (chemical and enzymatic dehydrogenation of deuteriosuccinate) and by Bernhard (acetylation of sulfonamides after ingestion of deuterio-ethanol). On the other hand tritium and tritiated compounds are available since the early fifties. A series of most informative experiments on isotopic selection between H, D and T has been performed by Du Vigneaud *et al.* (one-carbon-fragment metabolism). Already in these pioneer studies it was noticed, that the reactivity of deuterated or tritiated compounds is considerably lower, mainly because the bond between C and H is much stronger when the hydrogen is deuterium, than when it is protium, and still stronger when it is tritium.

Isotope effects can be studied (1) by *comparing* the reaction rates measured separately in presence of the different molecular species as they occur in tagged compounds; (2) by the simultaneous use of two different isotopes in the same compound e.g. D (or T) and ^{14}C . This technique of *doubly-labelling* is a sensitive

and efficient way for studying isotopic selection. However, the procedure of *intermolecular* doubly-labelling may be misleading and therefore the more reliable technique of *intramolecular* doubly-labelling is preferable. In this report three examples of C-H/C-D — isotope effects shall be discussed in more detail :

1. Oxidation of *formate*. This is the most simple compound suitable for the study of primary isotope effects. Formate oxidation in presence of the following enzyme systems have been tested : (a) formicodehydrogenase (E.C. 1.2.1.2.) from phaseolus, (b) catalase from beef liver (E.C. 1.11.1.6.) and (c) formicodehydrogenase from *E. coli* (E.C. 1.2.2.1.). There is an isotope effect of $k_H/k_D = 2-3$ in the plant enzyme. There may or may not be an isotope effect in the catalase system depending on the nature of the limiting factor in peroxidatic oxidation ($k_H/k_D = 1.0-1.5$). On the other hand formate oxidation by alkaline permanganate exerts a most pronounced isotope effect ranging from $k_H/k_D = 6$ to 10.

2. Oxidation of *ethanol*. The overall reaction rate for the enzymatic dehydrogenation of ethanol and for the reduction of acetaldehyde is considerably reduced if H is replaced by D in the donor reactant (Shiner, Mahler and Douglas). Here the figures obtained for the yeast and the liver enzyme (E.C. 1.1.1.1.) are similar ($k_H/k_D = 1.75$ and 1.8). Furthermore there is a difference in the binding-dissociation constants for the deuterated (α -D-NADH₂) and the non-deuterated coenzyme. The two hydrogens in position 4 of NADH₂ are not configurationally equivalent, since only one (in position α) is transferred by this highly stereospecific reaction.

3. Oxidation of *succinate*. Enzymatic dehydrogenation of tetradeuterated succinate by heart-muscle preparation exerts an isotope effect of $k_H/k_D = 4.5-5.5$. In presence of excess substrate there is an almost linear relationship between deuterium content of the substrate and reaction velocity (Thorn). This effect is likely to be due to a difference in maximal velocity (V_{max}) as well as, to some extent, a difference in affinity (K_m).

Although there are not many examples studied in detail so far, they demonstrate, that it is very difficult to make generalizing statements or predictions about the extent or the sense of changes in affinity or maximal reaction velocity, when H is replaced by D (or T) in a compound which may undergo dehydrogenation in the organism. Isotope effects do not only occur in chemical and enzymatic reactions; they may also take place in analytical procedures, such as column chromatography, CO₂-absorption or even recrystallisation. The study of isotope effects, notably among H, D and T has to be considered as valuable tool in the study of the reaction mechanism and the stereospecificity of enzymes involved in oxidoreductions and the transfer of one-carbon-fragments.

REFERENCES

1. Deuterium isotope effects in chemistry and biology. David Kritchevsky, Editor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **84** : 573-781 (1960).
2. Tritium in the physical and biological sciences. *Proceedings of the Symposium on the detection and use of Tritium in the physical and biological sciences*. IAEA (1962).
3. Isotope mass effects in chemistry and biology. *Proceedings of the Symposium on isotope mass effects in chemistry and biology. Pure and Applied Chemistry*, **8** : 1-552 (1964).

Effets cinétiques isotopiques dans les études métaboliques avec composés deutérés et tritiés.

H. AEBI (Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern, Schweiz).

L'emploi d'un isotope comme traceur est basé sur la supposition que la petite minorité des molécules marquées est répartie et métabolisée dans l'organisme exactement comme les molécules non marquées. Afin que cette supposition se réalise, deux conditions doivent être remplies :

- 1) L'isotope servant comme traceur doit être attaché *solidement* à la molécule, de sorte qu'une perte due à un échange isotopique soit exclue.
- 2) Aucune *discrimination* ne doit se produire entre les différentes espèces moléculaires, par exemple le composé doit être marqué de telle façon que la molécule marquée et les autres ne puissent pas être distinguées par l'organisme.

La première condition est une question du choix approprié de l'atome servant comme traceur, en tenant compte de sa nature chimique et de sa position dans la molécule. La deuxième dépend de la mesure dans laquelle les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la molécule sont altérées par l'introduction d'un atome isotopique comme traceur. Il faut s'attendre à des différences dans les vitesses de réaction, appelés effets cinétiques des isotopes, surtout si la masse de l'atome isotopique employé pour le marquage est assez différente de celle de la masse abondante du même élément non marqué. Elles sont donc très prononcées parmi les isotopes de l'hydrogène, par exemple le protium (^1H), le deutérium (^2H ou D) et le tritium (^3H ou T). Par surcroît, la grandeur d'un effet isotopique dépend du type de la réaction chimique et de la période de temps pendant laquelle la sélection isotopique est effective. En principe, les vitesses des réactions sont moins atteintes que les équilibres. Si l'endroit de la substitution isotopique est directement impliqué dans la rupture d'une liaison ou dans la formation d'une liaison dans la réaction, on parle d'effet isotopique *primaire*; s'il n'est pas impliqué, il est appelé effet isotopique *secondaire* (éloigné). D'habitude, les premiers sont plus grands que les deuxièmes.

A cause de l'emploi fréquent de ^3H et ^2H comme traceurs en biochimie et en pharmacologie, les effets isotopiques entre ces espèces sont de grande importance pratique. Le deutérium, surtout sous forme de son oxyde, est disponible depuis 1932, quand Urey *et al.* ont réussi à concentrer l'eau lourde par électrolyse ou par distillation. Des expériences classiques utilisant le deutérium comme traceur ont été faites dans ce pays il y a déjà trois décades par Erlenmeyer (déshydrogénation chimique et enzymatique du deutéro-succinate) et par Bernhard (acétylation des sulfonamides après ingestion de deutéroéthanol). D'autre part, du tritium et des composés tritiés sont disponibles depuis 1950 environ. Une série d'expériences plus instructives sur la sélection isotopique entre H, D, et T a été faite par Du Vigneaud *et al.* (métabolisme des fragments à un seul carbone). Déjà dans ces études de pionniers il a été remarqué que la réactivité des composés deutériés ou tritiés est considérablement plus basse, surtout parce que la liaison entre C et H est beaucoup

plus forte quand l'hydrogène est sous forme de deutérium, lorsqu'il est sous forme de protium, et encore plus forte quand il est sous forme de tritium.

Les effets isotopiques peuvent être étudiés : 1) en comparant les vitesses de réaction mesurées séparément en présence des différentes espèces moléculaires, comme elles ont lieu dans les composés marqués; 2) en employant simultanément deux isotopes différents dans le même composé, par exemple D (ou T) et ^{14}C . Cette technique du double marquage est un moyen sensible et efficace pour étudier la sélection isotopique. Cependant, le procédé du double marquage *intermoléculaire* peut induire en erreur, et l'on doit donc préférer la technique plus sûre du double marquage *intramoléculaire*. Dans ce rapport, trois exemples d'effets isotopiques C-H/C-D seront discutés en détail :

1. Oxydation du *formiate*. C'est le composé le plus simple approprié à l'étude des effets isotopiques primaires. On a étudié l'oxydation du formiate en présence des systèmes enzymatiques suivants : a) formicodehydrogénase (E.C. 1.2.1.2.) de *phaseolus*, b) catalase du foie de bœuf (E.C. 1.11.1.6.) et c) formicodéshydrogénase de *E. coli* (E.C. 1.2.2.1.). Il y a un effet isotopique de $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 2-3$ dans l'enzyme de la plante. On peut, ou on ne peut pas avoir un effet isotopique dans le système de la catalase, selon la nature du facteur limitant dans l'oxydation peroxydasique ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 1,0-1,5$). D'autre part, l'oxydation du formiate par le permanganate alcalin exerce un effet isotopique plus prononcé, variable de $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 6$ jusqu'à 10.

2. Oxydation de l'*éthanol*. La vitesse de la réaction totale pour la déshydrogénation enzymatique de l'éthanol et pour la réduction de l'acétaldéhyde est considérablement réduite si H est remplacé par D dans le réactif porteur (Shiner, Mahler et Douglas). Dans ce cas, les chiffres obtenus pour la levure et l'enzyme du foie sont semblables ($k_{\text{H}}/k_{\text{C}} = 1,75$ et 1,8). En outre, il y a une différence dans les constantes de dissociation des liaisons pour le coenzyme deutérié ($\alpha\text{-D-NADH}_2$) et le coenzyme non deutérié. Les deux hydrogène en position 4 de NADH_2 ne sont pas équivalents du point de vue de la configuration, car seulement un (dans la position α) est transféré par cette réaction hautement stéréospécifique.

3. Oxydation du *succinate*. La déshydrogénation enzymatique du succinate tétradeutérié par une préparation du muscle du cœur exerce un effet isotopique de $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 4,5-5,5$. En présence d'un excès du substratum, il y a une relation presque linéaire entre le contenu en deutérium du substratum et la vitesse de la réaction (Thorn). Cet effet est probablement dû à une différence dans la vitesse maximale (V_{max}) ainsi que, jusqu'à un certain point, à une différence d'affinité (K_m).

Bien qu'il n'y ait pas jusqu'à présent beaucoup d'exemples étudiés en détail, ils démontrent qu'il est très difficile de faire des énoncés généraux ou des prévisions au sujet de l'étendue ou du sens des changements d'affinité ou de la vitesse maximale de réaction, quand H est remplacé par D (ou T) dans un composé qui peut subir la déshydrogénation dans l'organisme. Des effets isotopiques ne se produisent pas seulement dans des réactions chimiques et enzymatiques; ils peuvent aussi avoir lieu dans l'application de procédés analytiques, tels que la chromatographie sur colonne, l'absorption du CO_2 ou même la recristallisation. L'étude des effets isotopiques particulièrement

entre H, D et T, doit être considérée comme un instrument précieux dans l'étude du mécanisme des réactions et de la stéréospécificité des enzymes impliquées dans des réactions d'oxydoréductions et du transfert des fragments à un seul carbone.

REFERENCES

1. Deuterium isotope effects in chemistry and biology. David Kritchevsky, Editor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **84** : 573-781 (1960).
2. Tritium in the physical and biological sciences. *Proceedings of the Symposium on the detection and use of Tritium in the physical and biological sciences*. IAEA (1962).
3. Isotope mass effects in chemistry and biology. *Proceedings of the Symposium on isotope mass effects in chemistry and biology. Pure and Applied Chemistry*, **8** : 1-552 (1964).

Drug tolerance by increased drug metabolism.

H. REMMER (Institut für Toxikologie, Universität Tübingen, Deutschland).

Drug tolerance should be viewed as an adaptation of an organism or a single cell to an effective foreign compound either by a decreasing response of the receptor sites or by an accelerated breakdown of the active agent.

Tolerance to alkaloids such as morphine, nicotine, and related drugs is due to a diminished response of cells in the CNS or in the ganglia. However, decreased sensitivity of the receptor plays a minor role in the tolerance to hypnotics and similar compounds if they are converted to inactive metabolites by enzymes of the endoplasmic reticulum of the liver cells. A high single dose or repeated smaller doses of such drugs induce the metabolizing enzyme-system. More enzymes are produced and the hydroxylation rate increases.

The main enzyme of the hydroxylating system is a cytochromal mixed function oxidase which is completely unspecific. It activates molecular oxygen and hydroxylates numerous lipid soluble foreign compounds.

This is the reason why an induction of this enzyme produces an increase of the metabolism of the inducing agent as well as almost all drugs which are converted by the hydroxylating enzyme.

The inducing capacity is not a peculiar property of hypnotics and related compounds. Numerous lipid soluble drugs, such as nikethamide, anti-histaminics, and the antibioticum grisesulfon are even so well known as inducers.

After repeated doses of strong inducing agents the amount of additional enzymes situated in the endoplasmic reticulum increases.

However, enzymes which have nothing to do with the hydroxylation of foreign compounds are induced slightly or not at all. Simultaneously the smooth membranes of the endoplasmic reticulum multiply as can be seen with the electrone-microscope. Morphologic changes in other structures of the liver cells are not observed. Chemical determinations of the constituents of smooth membranes isolated from the liver confirmed the growth of these cell structures. The proliferation starts with an accelerated incorporation of labelled amino acids into proteins and of radiophosphate into lipids of the endoplasmic reticulum. The increase of the smooth membranes is accompanied by

a typical hypertrophy of the liver. The total amount of proteins and phospholipids rises correspondingly with the growth of the liver.

The consequences of increased drug metabolism for therapy and for the evaluation of new drugs will be discussed.

Tolérance aux médicaments par une augmentation de leur métabolisme.

H. REMMER (Institut für Toxikologie, Universität Tübingen, Deutschland).

La tolérance aux médicaments devrait être considérée comme une adaptation d'un organisme ou d'une seule cellule à un composé actif étranger, soit par une diminution de la réaction des récepteurs, soit par inactivation accélérée de l'agent actif.

La tolérance aux alcaloïdes, tels que la morphine, la nicotine et les médicaments connexes, est due à une réaction diminuée des cellules dans le SNC ou dans les ganglions. Cependant, la sensibilité diminuée du récepteur joue un rôle mineur dans la tolérance aux hypnotiques et aux composés semblables, s'ils sont convertis en métabolites inactifs par des enzymes du réticulum endoplasmique des cellules du foie. Une seule dose élevée ou des doses plus petites répétées de tels médicaments provoquent le système enzymatique métabolisant. Plusieurs enzymes sont produites, et la vitesse d'hydroxylation augmente.

L'enzyme principale du système hydroxylant est une oxydase à fonction mixte cytochromale, qui est absolument non spécifique. Elle active l'oxygène moléculaire et elle hydroxyle de nombreux composés étrangers solubles dans les lipides. C'est la raison pour laquelle une induction de cette enzyme provoque une augmentation du métabolisme de l'agent inducteur, ainsi que presque tous les médicaments qui sont transformés par l'enzyme hydroxylant.

La capacité inductrice n'est pas une propriété particulière des hypnotiques et des composés connexes. De nombreux médicaments solubles dans les lipides, tels que le nikethamide, les antihistaminiques et l'antibiotique grisesulfon sont également bien connus comme inducteurs.

Après des doses répétées d'agents inducteurs forts, la quantité d'enzymes additionnelles situées dans le réticulum endoplasmique augmente. Cependant, des enzymes qui n'ont rien à faire avec l'hydroxylation de composés étrangers sont induites légèrement ou pas du tout. Simultanément, les membranes lisses du réticulum endoplasmique se multiplient, comme on peut le voir avec le microscope électronique. Des modifications morphologiques dans différentes structures du foie ne sont pas observées. Des déterminations chimiques des constituants des membranes lisses isolées du foie ont confirmé l'accroissement de ces structures cellulaires. La prolifération commence avec une incorporation accélérée d'acides aminés marqués dans des protéines et de radiophosphate dans des lipides du réticulum endoplasmique. L'augmentation des membranes lisses est accompagnée par une hypertrophie typique du foie. La quantité totale des protéines et des phospholipides augmente proportionnellement à l'augmentation du foie.

Les conséquences de l'augmentation du métabolisme des médicaments pour la thérapeutique et pour la détermination de nouveaux médicaments seront discutées.

Models for kinetics in pharmacology.

G. SEGRE (University of Camerino, Italy).

Compartmental models used in the study of drug kinetics can also be employed in the analysis of the kinetics of drug effects. In this case it is necessary to linearize the effects so that the system could be treated as a linear black box whose input is given by the drug concentration and the output by the effect. The probit transformation of the effects can provide such a linearization.

Such a procedure has been used to study the kinetics of nor-epinephrine effect on blood pressure in cats. The input is given in this case by the time course of the plasma radioactivity due to nor-epinephrine after the i. v. injection of tritiated nor-epinephrine. The output is given by the time course of the blood pressure, in probit units, after the probit transformation of the dose-effect curve of nor-epinephrine in cats.

A multicompartamental model has been formulated to which the kinetics of plasma nor-epinephrine, of its O-methyl-derivative and of the blood pressure have been fitted simultaneously through the use of the SAAM program and a digital computer (IBM 7094).

The time course of a drug at the receptor level can be analyzed with the use of the model suggested by the author (G. Segre, *Isotopes in Experimental Pharmacology*, L. J. Roth Ed., The University of Chicago Press, Chicago, 1965, p. 157).

The kinetics of Pentobarbital at the receptor level has been thus analyzed by using the times of disappearance and of reappearance of the righting reflex in rats and by determining the Pentobarbital concentrations at various times in different parts of the brain and in other organs of the rat.

Modèles de cinétique en pharmacologie.

G. SEGRE (Université de Camerino, Italie).

Des modèles compartimentaux employés dans l'étude de la cinétique des médicaments peuvent aussi être employés dans l'analyse de la cinétique des effets des médicaments. Dans ce cas, il est nécessaire de rendre linéaires les effets de façon que le système puisse être traité comme une boîte noire linéaire, dont l'entrée est donnée par la concentration du médicament et la sortie par l'effet. La transformation en probit des effets peut fournir une telle linéarisation.

Un tel procédé a été utilisé pour étudier la cinétique de l'effet de la nor-

épinéphrine sur la pression sanguine chez le chat. L'entrée est, dans ce cas, donnée par la durée de la radioactivité du plasma due à la nor-épinéphrine après l'injection intraveineuse de nor-épinéphrine tritiée. La sortie est donnée par la durée de la pression sanguine, en unités probit, après la transformation en probit de la courbe dose-effet de la nor-épinéphrine chez le chat.

Un modèle multicompartimental a été présenté, dans lequel la cinétique de la nor-épinéphrine du plasma, de son dérivé orthométhylé et de la pression sanguine, ont été ajustées simultanément en employant le programme SAAM et un calculateur digital (IBM 7094).

La durée d'un médicament au niveau du récepteur peut être analysée en employant le modèle proposé par l'auteur (G. Segre, *Isotopes in Experimental Pharmacology*, L. J. Roth Ed., The University of Chicago Press, Chicago, 1965, p. 157).

La cinétique du pentobarbital au niveau du récepteur a été ainsi analysée en employant les temps de disparition et de réapparition du réflexe d'équilibre chez le rat, et en déterminant les concentrations du pentobarbital à différents temps dans les différentes parties du cerveau et dans les autres organes du rat.

Application des modèles.

Y. COHEN (Dépt. des Radioéléments, C. E. A., Saclay, France).

Le développement des méthodes de radioactivité en pharmacologie a conduit à une multiplication des résultats pour une série donnée d'expériences. Ces résultats deviennent suffisamment nombreux et suffisamment précis pour être analysés mathématiquement suivant des conceptions modernes. A partir d'une analyse mathématique, il est possible de concevoir le modèle physique du phénomène physiologique associé à l'action d'une substance active d'origine biologique ou de synthèse (médicament, poison, médiateur chimique).

La validité du modèle dépend de la précision des résultats, de la prise en considération de tous les phénomènes physiologiques impliqués dans l'effet pharmacodynamique et de la variabilité inhérente à l'organisme animal.

Nous nous proposons à l'aide d'exemples choisis dans les travaux du laboratoire de montrer l'intérêt, grâce aux molécules marquées ou aux radioéléments, des méthodes d'intégration des phénomènes physiologiques, de préciser la portée et de définir les limites de ces nouveaux moyens d'investigation.

Application of models.

Y. COHEN (Dépt. des Radioéléments, C. E. A., Sclay, France).

The development of radioactivity methods in Pharmacology has led to a multiplication of results for a given series of experiments. These results are

becoming sufficiently numerous and precise to be analysed mathematically according to modern concepts. From such a mathematical concept it is possible to imagine the physical model of the physiological action of an active substance of biological or synthetic origin (medicine, poison, chemical mediator).

The validity of the model depends upon the precision of the results, taking into consideration all the physiological phenomena implicated in the pharmacodynamic effect, and also the inherent variability of the animal organism.

With the aid of examples chosen from work done in our laboratory, we propose to show the advantages of methods employing labelled molecules, or radioelements in the integration of physiological phenomena. We propose also to specify the scope, and to define the limits of these new methods of investigation.

Les cellules adipeuses isolées, un modèle expérimental utile dans l'étude de la lipolyse, de l'antilipolyse et de la synthèse des protéines.

B. JEANRENAUD (Institut de Biochimie clinique, Université de Genève, Genève Suisse).

Les cellules adipeuses, isolées selon le procédé de Rodbell (*J. Biol. Chem.* **239**, 375, 1964) sont un modèle expérimental très utile puisqu'il est constitué d'une seule série de cellules remarquablement homogènes permettant la comparaison simultanée d'un grand nombre d'agents métaboliques différents. Les expériences récentes faites dans notre laboratoire nous ont permis d'analyser, grâce à cette technique, deux aspects du métabolisme intermédiaire.

a) Le premier consiste à comparer les effets métaboliques induits par des agents lipolytiques (ACTH, adrénaline, glucagon) à ceux induits par des agents antilipolytiques (insuline, ouabaïne, acide nicotinique). Il a été possible de constater que bien que les agents du groupe lipolytique aussi bien que ceux du groupe antilipolytique stimulaient le métabolisme du glucose, les effets qualitatifs de cette stimulation étaient nettement différents d'un groupe à l'autre, mais semblables à l'intérieur d'un même groupe. Ces différents tableaux métaboliques semblent être en relation avec la concentration intracellulaire des acides gras libres. En l'absence de glucose et lorsque l'activité lipolytique de la cellule est mesurée, on observe que certains agents antilipolytiques tels que l'ouabaïne paraissent agir en inhibant l'activité de l'adényl cyclase, une inhibition qui est probablement à mettre en relation avec une baisse du potassium intracellulaire.

b) Le deuxième aspect du métabolisme intermédiaire qui a été étudié a été celui du métabolisme des acides aminés. Puisqu'il est raisonnable de penser que les protéines de l'adipocyte sont avant tout des protéines enzymatiques, il était intéressant d'en étudier la synthèse. Ces expériences nous ont permis de constater que les cellules adipeuses isolées sont en effet capables

d'accumuler un acide non métabolisable tel que l'acide α -aminoisobutyrique. D'autre part, la synthèse de protéine à partir de leucine-U- ^{14}C se fait rapidement et continue linéairement pendant les quatre heures d'incubation utilisées. Cette synthèse est stimulée par la présence d'insuline même en l'absence de glucose dans le milieu d'incubation. La pénétration de la leucine-U- ^{14}C dans l'adipocyte semble se faire d'une part par diffusion simple, d'autre part par un système de transport saturable et présentant des caractéristiques de compétition entre certains acides aminés. Ce système de transport paraît activé par le sodium et inactivé par le potassium. En présence de sodium ce système de transport est clairement stimulé par l'insuline bien qu'il ne soit pas possible d'exclure que cette hormone agisse simultanément au niveau de quelque étape intracellulaire de la protéosynthèse.

Ces deux types d'expériences permettent de souligner l'importance de la technique des cellules adipeuses isolées dans l'étude de l'action d'hormone ou d'autres agents métaboliques sur le métabolisme intermédiaire.

The isolated fat cells, as a useful tool in the study of lipolysis, antilipolysis, and protein synthesis.

B. JEANRENAUD (Institut de Biochimie Clinique, Université de Genève, Genève, Suisse).

The isolated fat cells prepared according to Rodbell (*J. Biol. Chem.* **239**, 375, 1964) are a very useful system, as it consists in a single series of homogeneous cells which permits the simultaneous comparison of several different agents. Using this technique two aspects of the intermediary metabolism have been studied.

(a) Firstly, the metabolic effects induced by lipolytic agents (ACTH, epinephrine, glucagon) and by antilipolytic agents (insulin, ouabain, nicotinic acid) have been compared. Although both groups of agents were found to stimulate the metabolism of glucose by the isolated fat cells, the metabolic patterns of this stimulatory effect were found to differ markedly from one group to the other. On the contrary, within one group of agents it was quite similar. The results obtained support the view that these different metabolic patterns may be related to the levels of free fatty acids within the adipocyte.

When glucose was omitted in the incubation medium, and when lipolytic activity of the cells was measured, it was found that antilipolytic agents such as ouabain were probably acting through actual inhibition of the adenylyl-cyclase, an inhibition which appeared to be related to a decreased intracellular potassium levels.

(b) The second aspect of the intermediary metabolism studied has been that of amino acids. As, in these cells, proteins are likely to represent mostly enzymatic proteins, their synthesis from labelled amino acid was of evident interest. It was found that the fat cells were able to accumulate a non-metabolizable amino acid such as α -aminoisobutylic acid. Protein synthesis from leucine-U- ^{14}C took place rapidly, proceeded linearly during the 4-hour incubation used, and was clearly stimulated by insulin even in the absence of

glucose in the medium. Leucine appeared to penetrate into the cells by simple diffusion on the one hand, by a transport system on the other. This transport system was found to be saturable and to exhibit some degree of competition between amino acids. Furthermore, it was found to be activated by sodium, possibly inactivated by potassium. The action of insulin upon protein synthesis was consistent with a stimulatory effect upon the transport system when sodium was present in the incubation medium, although additional intracellular action could not be excluded.

These two series of investigations stress the usefulness of the isolated fat cell preparation in the study of the action of hormones or of other agents upon the intermediary metabolism.

Utilisation des radioindicateurs dans l'étude des mécanismes de la carcinogenèse chimique.

Mme P. DAUDEL (Institut du Radium, Paris, France).

Au cours des années récentes, la méthode des radioindicateurs a permis de préciser la nature d'un certain nombre des réactions chimiques et biochimiques qui se produisent lorsqu'une substance cancérigène entre en contact avec des tissus animaux. Ces données sont d'une importance évidente en vue de l'étude du mécanisme de la carcinogenèse.

Les principaux faits établis concernent l'interaction *in vivo* des corps cancérigènes avec les protéines et les acides nucléiques, ainsi que les perturbations apportées à la biosynthèse de ces macromolécules par ces substances exogènes. On a ainsi montré, grâce à l'emploi de molécules marquées par le radiocarbone ou le tritium, que certains hydrocarbures conjugués forment avec un groupe particulier de protéines des complexes dont la structure chimique a pu être partiellement précisée. On s'est de plus aperçu que l'aptitude de ces hydrocarbures à former ces complexes est en relation directe avec leur pouvoir cancérigène, ce qui suggère que ce phénomène pourrait constituer une des étapes importantes de la carcinogenèse. Des faits analogues ont également été observés dans la famille des molécules azoïques.

Des études similaires ont par ailleurs mis en évidence un parallélisme entre le pouvoir cancérigène des hydrocarbures conjugués et leur tendance à former des complexes avec les acides nucléiques. L'effet des alcoylants cancérigènes sur les acides nucléiques a été analysé d'une façon particulièrement approfondie : on a noté par exemple l'alcoylation de la guanine en position 7.

Plus récemment, l'intérêt s'est porté sur les nombreuses perturbations que l'on observe dans la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques, chez les animaux traités par des substances oncogènes. Selon les cas, ces substances provoquent une stimulation ou une inhibition de certaines étapes de ces synthèses mais aucun lien net ne semble encore avoir été mis en évidence entre ces perturbations et le pouvoir cancérigène.

Nous nous proposons d'analyser les faits qui nous paraissent les plus importants dans le domaine précité en insistant sur la nature des techniques utilisées. Nous nous efforcerons d'indiquer quelles sont les hypothèses que ces faits suggèrent, quant au mécanisme des premiers stades de la carcinogénèse chimique. Signalons dès maintenant que dans le cas des hydrocarbures et des azoïques, l'accent est généralement placé sur l'interaction des corps cancérogènes et des protéines, selon un processus classique de régulation, cette interaction enzymatique contrôlant la division cellulaire. Dans le cas des substances alcoylantes, c'est l'interaction avec les acides nucléiques qui paraît la plus spectaculaire et qui conduit à l'idée qu'une mutation pourrait se produire dès les premières étapes du phénomène.

Utilisation of radioindicators in the study of chemical carcinogenesis mechanisms.

Mme P. DAUDEL (Institut du Radium, Paris, France).

In recent years the method of radioindicators has made it possible to define a certain number of the chemical and biochemical reactions happening when a cancerogenic substance comes into contact with animal tissues. The importance of these facts is evident in view of the study of the carcinogenesis mechanism.

The principal facts established concern the interaction *in vivo* of cancerogenic compounds with proteins and nucleic acids, as well as the disturbances caused to the biosynthesis of these macromolecules by these exogenous substances. It has thus been demonstrated, thanks to the use of compounds labelled by radiocarbon or tritium, that certain conjugated hydrocarbons form with a particular group of protein complexes, whose chemical structure could be partially defined. In addition, it has been noted that the ability of these hydrocarbons to form these complexes is in direct relation to their cancerogenic power, which suggests that this phenomenon might constitute one of the important stages of experimental carcinogenesis. Similar facts have also been observed in the azoic compounds group.

Further studies have brought to light a parallelism between the cancerogenic power of conjugated hydrocarbons and their tendency to form complexes with nucleic acids. The effect of cancerogenic alkylating compounds on nucleic acids has been analysed in detail : for example, guanine alkylation is observed in position 7.

More recently, investigations have been directed on the numerous disturbances which can be observed in the biosynthesis of nucleic acids and proteins in animals treated with cancerogenic substances. These substances provoke a stimulation or an inhibition of certain steps of these syntheses, but no clear link seems to have appeared yet between these disturbances and the cancerogenic power.

We intend to discuss those facts which seem to us of the greatest importance and to stress the kind of techniques used. We will try to indicate the assumptions suggested by these facts, as far as the mechanism of the first

stages of chemical carcinogenesis is concerned. We can point out at this stage that in the case of hydrocarburates and azoics, the emphasis is generally placed on the interaction of the cancerous bodies and the proteins, according to a classic regulation process, and this interaction could lead to the inhibition of the synthesis of an enzymatic fraction controlling the cellular division. In the case of alcoylant substances, it is the interaction with nucleic acids which appears the most spectacular and which leads to the idea that a mutation might be produced in the first stages of the phenomenon.

The mode of action of some cytotoxic compounds analyzed by use of labelled molecules.

H. LETTRÉ (Institut für experimentelle Krebsforschung, Universität Heidelberg, Deutschland).

The use of labelled molecules for the analysis of the mode of action of cytotoxic compounds includes the following possibilities : (1) labelling of the tumor-bearing host, (2) labelling of the cells of the tumor, (3) labelling of the cytotoxic compound, and (4) labelling of metabolites.

The first possibility has not been used systematically. Labelling of the tumor cells provides the possibility to determine their rate of growth. The change of this growth rate under the action of cytotoxic compounds makes it feasible in characteristizing this material, however this method only gives an overall picture. The labelling of the cytotoxic compounds permits the study of their distribution in the organism, their activation or inactivation, degradation and excretion. The point of attack inside the target cell can be determined either by methods of fractionation of cell compounds or by autoradiography. The labelling of metabolites is the most valuable indicator for the effect of cytotoxic agents. The metabolic disturbances in the fields of carbohydrates, proteins, nucleic acids and lipids can be studied by biochemical methods. These different possibilities will be discussed as examples for the utilization of some cytotoxic compounds and mitotic poisons.

Mode d'action de quelques composés cytotoxiques analysés à l'aide de molécules marquées.

H. LETTRÉ (Institut für Experimentelle Krebsforschung, Universität Heidelberg, Deutschland).

L'emploi des molécules marquées pour l'analyse du mode d'action des composés cytotoxiques comprend les possibilités suivantes :

- 1) marquage du porteur de la tumeur;
- 2) marquage des cellules de la tumeur;

3) marquage du composé cytotoxique

4) et marquage des métabolites.

La première possibilité n'a pas été utilisée systématiquement. Le marquage des cellules tumorales permet de déterminer leur vitesse d'accroissement. La variation de cette vitesse d'accroissement sous l'action des composés cytotoxiques permet de caractériser ce matériel; cependant, cette méthode donne seulement un aperçu général. Le marquage des composés cytotoxiques permet l'étude de leur distribution dans l'organisme, leur activation ou inactivation, leur dégradation et excrétion. Le point d'attaque à l'intérieur de la cellule visée peut être déterminé soit par des méthodes de fractionnement de composés cellulaires, soit par l'autoradiographie.

Le marquage des métabolites est l'indication la plus valable pour l'effet des agents cytotoxiques. Les troubles métaboliques dans les domaines des hydrates de carbone, des protéines, des acides nucléiques et des lipides, peuvent être étudiés par des méthodes biochimiques.

Ces différentes possibilités seront discutées en tant qu'exemples pour l'utilisation de quelques composés cytotoxiques et de quelques poisons mitotiques.