

## Informations - Informationen - Informazioni - Notes

### STUDIORUM PROGRESSUS

#### Essais d'élaboration des voies d'approche à la chimiothérapie du cancer. Action sur l'eau d'hydratation des tissus néoplasiques; action sur les protéines.

Par I. GRUNDLAND<sup>1</sup>, Paris

L'action chimiothérapeutique contre le cancer est rendue difficile du fait de l'ignorance dans laquelle nous nous trouvons en ce qui concerne la cause même de cette affection. Aussi la prétention de guérir le cancer est pour le moment dépourvue d'un point de départ certain. Cependant, ce défaut momentané des connaissances touchant l'origine du cancer ne doit nullement empêcher la prétention d'influer et peser sur le développement de la tumeur. Ici nous entrons dans le domaine des notions parfaitement établies, et une incursion thérapeutique est susceptible d'être tentée avec succès.

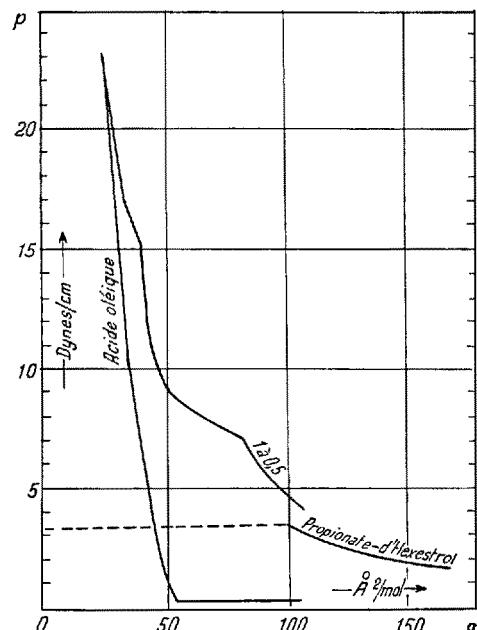
La tumeur en se développant nécessite la présence des éléments composants les tissus tels que: l'eau, les sucres, les lipides, les protéines et nucléoprotéines, les oligo-éléments et divers. Une action thérapeutique peut peser sur ces ressources indispensables à la prolifération cellulaire et ralentir sa marche — cela peut constituer un premier pas vers la chimiothérapie du cancer.

Un effort dans ce sens concernant les glucides a été effectué récemment<sup>2</sup>. L'introduction de la d-glucosamine consommant l'A.T.P. (en vue de la formation de d-glucosamine-6-phosphate) ralentit la phosphorylation du glucose utilisable par la tumeur et l'on obtient ainsi une survie prolongée des souris traitées portant des sarcomes.

Un effort analogue concernant le taux d'hydratation des tissus tumoraux semble avoir été effectué et est susceptible d'être tenté. Ainsi c'est là un fait connu que l'augmentation du taux d'hydratation des tissus néoplasiques. On peut supposer que l'activité mitotique intense au niveau de la tumeur peut être en partie tributaire de plus d'aisance de la réactivité chimique se faisant dans une phase davantage aqueuse. Il serait par conséquent non sans importance d'égaliser le taux d'hydratation de l'ensemble des tissus afin d'éviter de favoriser les mitoses (ou les réactions chimiques en général) en un point distinct de l'organisme. Il semble qu'on puisse attribuer un tel effet dans l'organisme aux diverses substances œstrogènes lors de leur administration dans les affections cancéreuses. En effet, en ce qui concerne les hormones stéroïdiennes il n'est pas sans intérêt de rappeler le travail de DAVIS, KRAHL et CLOWES<sup>3</sup> mettant en évidence, par l'étude en films monomoléculaires, l'existence des associations moléculaires (dues aux forces de VAN DER WAALS) entre stérols et hydrocarbures polycycliques. Ainsi les hydrocarbures (tels le benzopyrène ou méthylcholantrène) ne se dispersent pas sur le plan de l'eau par suite de l'absence de groupements polaires, d'où impossibilité d'évaluer leur surface moléculaire par la technique des films superficiels; par l'association stérol + hydrocarbure on obtient des surfaces moléculaires dépassant

celle du stérol seul ( $40 \text{ \AA}^2/\text{mol.}$ ) la différence permettant d'apprécier la surface moléculaire des hydrocarbures.

D'après les résultats expérimentaux de ces auteurs on est autorisé de conclure que par suite de l'intervention d'une substance à structure stérolique, certains composés deviennent moins hydrophobes, et on peut alors supposer que cette action est certainement encore moins malaisée vis-à-vis des tissus déjà hydratés, mais peut-être pas assez ou pas uniformément. Les tissus environnant ceux de la tumeur peuvent par suite de l'intervention de ces substances stéroliques devenir moins imperméables à l'eau d'hydratation des tissus cancéreux (s'y trouvant en excès) — il en résulterait une certaine homogénéisation du taux d'hydratation, ce qui pourrait influer sur la croissance d'un point distinct de l'organisme en l'occurrence de la tumeur.



Isotherme  $P = f(\sigma)$  des films monomoléculaires mixtes acide oléique — propionate d'hexestrol. Propionate d'hexestrol — élément variable. Lectures des points toutes les 3 min (5 min après l'étalement) dans le sens de la compression.

Nous avons montré<sup>1</sup> que ce raisonnement était valable pour les œstrogènes de synthèse dérivés des stilbènes. Ainsi, alors que le film monomoléculaire du propionate d'hexestrol peut-être suivi jusqu'à une pression de 3,5 dynes/cm et présente alors une surface de  $100 \text{ \AA}^2/\text{mol}$  au-delà de cette pression, le film gazeux se collabre, d'où impossibilité de continuer les mesures. Cependant, lorsqu'on projette sur le plan de l'eau un mélange contenant deux molécules d'acide oléique pour une molécule de propionate d'hexestrol — pour des raisons de commodité de dessin, la courbe tracée représente la somme d'un acide oléique +  $\frac{1}{2}$  propionate d'hexestrol — on obtient un film superficiel résistant jusqu'à 7 dynes, avec — lorsqu'on accentue la pression — rupture du complexe, expulsion vers la phase aqueuse du propionate d'hexestrol et subsistance sur le plan de l'eau de l'acide oléique seul.

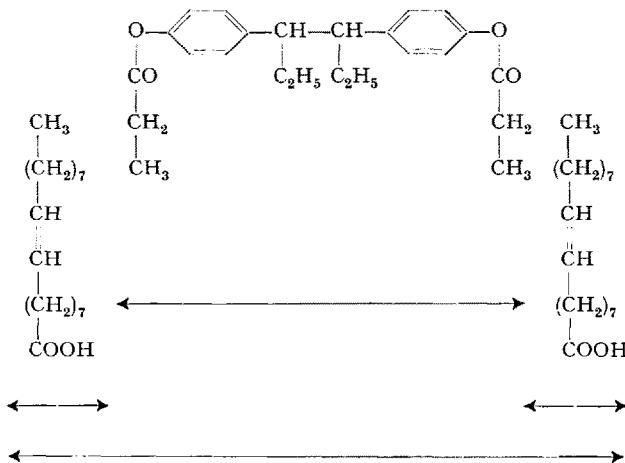
<sup>1</sup> Laboratoires du C.N.R.S., Faculté de Médecine, Paris.

<sup>2</sup> J. H. QUASTEL et A. CANTERO, Nature 171, 252 (1953).

<sup>3</sup> W. W. DAVIS, M. E. KRAHL et G. H. A. CLOWES, J. Amer. Soc. 62, 3080 (1940).

<sup>1</sup> J. GRUNDLAND, C. r. Soc. Biol. 142, 941 (1948).

L'augmentation de la résistance du film à la compression allant de 3 dynes/cm jusqu'à 7 dynes/cm, prouve une association entre l'hormone œstrogène de synthèse et somme toutes une substance à caractère surtout paraffinique - et le même raisonnement que celui exposé ci-dessus est susceptible d'être développé.



Orientation probable du film mixte acide oléique (2 mol) + propionate d'hexestrol (1 mol) sur le plan de l'eau.

On pourrait classer également dans cette même catégorie des substances servant de trait d'union entre la phase aqueuse et paraffinique - la p-hydroxypropiophénone, les tri- ou hexaméthylolmélamine, et comprendre les motifs de leur activité anticancéreuse.

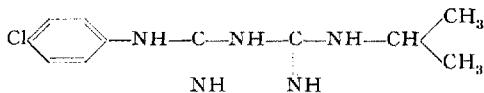
Nos recherches ont porté également sur la possibilité d'influencer la croissance tumorale par intervention dans le domaine des protéines, et à ce titre elles étaient destinées à toucher l'élément fondamental de la formation cellulaire.

L'hypothèse du point de départ serait la suivante: le protoplasme cellulaire enserre des gros agrégats protéiques provenant de la condensation (peptidisation) se faisant aux dépens de la fraction protéique libre humaine (à poids moléculaire moins élevé). Il faut croire qu'un remaniement protéique intense accompagne la prolifération cellulaire (et on connaît l'hyperpolypeptidémie des cancéreux) - il s'agit donc d'amener une condensation des éléments protéiques avant qu'elles n'atteignent la tumeur provoquant ainsi un retour à la normale du taux de la fraction protéique libre et également un ralentissement du turn-over de ces éléments à travers la tumeur.

Pour atteindre cet objectif, diverses substances ont été examinées, et l'étude du rapport entre leur structure moléculaire et le problème posé a permis d'isoler deux groupements utiles (au stade actuel de cette recherche). Ainsi l'on a été conduit de proposer et d'effectuer la synthèse des composés résumant les caractéristiques utiles.

Voici les observations effectuées:

A.-Il a été constaté qu'en partie l'action de la Paludrine



peut s'expliquer par la réduction du choc protéique dû à la libération dans le sang des fragments protéiques

des globules rouges éclatés (l'action sur le choc protéique présente une certaine analogie avec la tentative projetée de réduire la fraction protéique libre). En effet, lorsqu'on ajoute la Paludrine (60 mg dans 5 cm³ d'eau) au sérum sanguin (5 cm³) on observe un floculat (ph inchangé). Si l'on effectue une électrophorèse sur papier du surnageant, on constate un très sensible appauvrissement en protéines (par rapport au témoin), alors que le sédiment présente à l'électrophorèse sur papier une fraction protéique dénaturée qui ne migre pas et une autre qui migre, mais reste réduite - comparée au témoin.

Si l'on centrifuge le sérum sanguin après une pareille addition de Paludrine (durée de contact 15 min ou 24 h) - le culot de centrifugation séché soumis à la microanalyse révèle une teneur en:

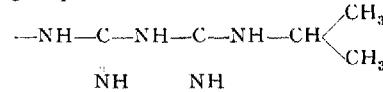
Cl - 0,5%	H - 8,85%
N - 9,33% {	1% N paludrine
8,33% N protéique	C - 58,57%

En admettant que tout le chlore appartienne à la Paludrine, on a (en comptant 5 N pour 1 Cl) 1% d'azote trouvé appartenant à la Paludrine, le restant 8,33% étant d'origine protéique. Il a été observé que toute la paludrine n'a pas précipité, mais celle précipitée a entraîné une fraction protéique - ce qui prouve la formation d'un complexe d'addition entre le biguanide et les protéines. Le chlorobenzène n'altère pas les protéines du sérum - la portion biguanide de la molécule paraît donc indispensable à cet effet.

Sur le sérum sanguin, après addition de la Paludrine, contact de 24 h et filtration, on a effectué une électrophorèse à l'appareil de TISELIUS.

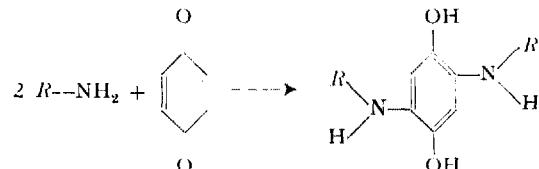
On observe une réduction moyenne de 12%  $\pm$  2% de la surface protéique totale, ce qui corrobore les résultats de la microanalyse du culot de centrifugation. L'albumine subit une réduction moyenne de 9%  $\pm$  2%, la  $\gamma$ -globuline reste sans changement, la  $\beta$ -globuline subit une réduction de la surface de 34%  $\pm$  2%, l' $\alpha$ -globuline subit une réduction de la surface de 18%  $\pm$  2%.

En somme, la formation d'un complexe d'addition entre les protéines et probablement les groupements imines du noyau biguanide a été constatée; il en a été retenu l'utilité, dans la structure à proposer, de la présence d'un groupement:



On peut noter que des doses considérables de Paludrine ont été employées, cependant le complexe d'addition mis en évidence dénote une qualité propre à chaque molécule de la substance envisagée; la somme des effets de chaque molécule s'enregistre plus facilement par les moyens d'analyse mis en œuvre sans que l'on puisse pour autant nier le phénomène à l'échelle moléculaire (ou à plus faibles doses - aussi l'on ne désire pas du tout précipiter toutes les protéines, ce qui serait plutôt gênant).

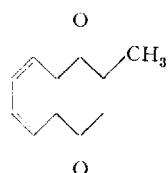
B. - La propriété des quinones de s'additionner aux protéines est connue. Elle peut être due, soit à la fixation des amines sur le noyau



soit à une liaison plus éphémère venant de la fonction quinone-hydroquinone (par pont hydrogène).

Nous avons mis en contact la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (vitamine K connue comme intervenant dans la coagulation sanguine) avec le sérum sanguin (à saturation) pendant 24 h. Après filtration une électrophorèse à l'appareil de TISELIUS est effectuée (après dialyse sur tampon au veronal). On note cette fois une réduction (par rapport au sérum témoin) de  $5\% \pm 2\%$  de la surface protéique totale. L'albumine subit une réduction moyenne de  $7\% \pm 2\%$ , la  $\gamma$ -globuline et l' $\alpha$ -globuline restent sans changement, la  $\beta$ -globuline subit une réduction de la surface de  $22\% \pm 2\%$ .

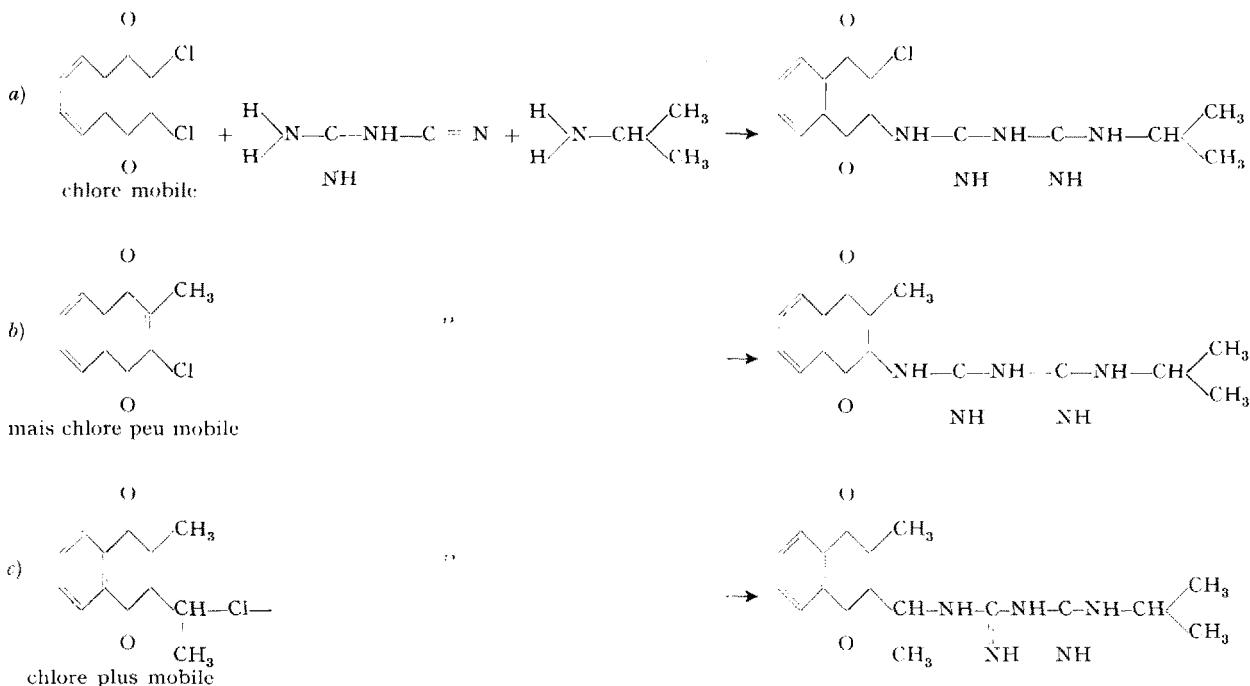
La propriété de former des complexes d'addition avec les protéines a été ainsi prouvée pour la vitamine K (ce qui expliquerait son mode d'action influençant la coagulation sanguine) – et nous avons conclu à l'utilité de ce fragment dans une structure moléculaire à proposer à titre d'anticancéreux de synthèse.



Ceci d'autant plus que par ailleurs nous avons constaté que les injections quotidiennes de la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone pratiquées à des rats porteurs d'un épithélioma transplantable de GUÉRIN permettent une survie appréciable aux animaux traités par rapport aux animaux témoins.

Ainsi nous avons été amenés à réaliser la synthèse des substances contenant les deux éléments dont l'utilité de chacun, prise à part, a été prouvée. La synthèse des substances suivantes a été tentée (formules a–c).

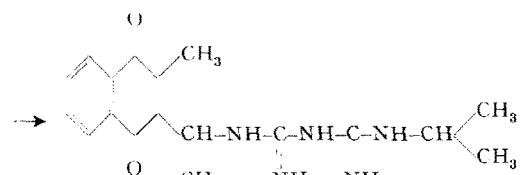
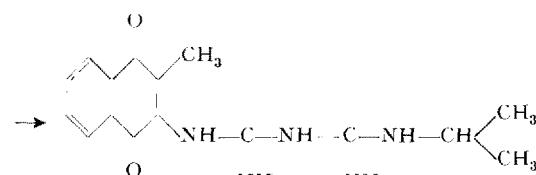
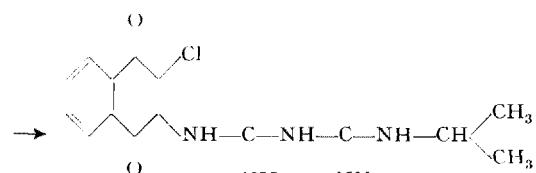
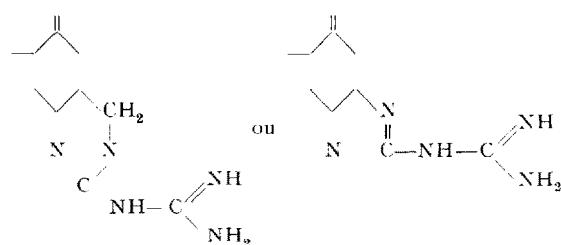
Une détermination électrophorétique au TISELIUS a été pratiquée sur le sérum sanguin ( $5 \text{ cm}^3$ ) additionné de  $\text{N}_1(3-\gamma\text{-chloroéthyl}-2\text{-méthyl-1,4-naphtoquinone})-\text{N}_5\text{-diméthyl-biguanide}$  – structure incertaine, non confirmée



par la microanalyse – à saturation (contact de 48 h dans le sac de cellophane durant la dialyse sur tampon au véronal à pH 8,6 et filtration précédent l'essai électrophorétique). Par action de ce composé, qui réalise dans sa structure moléculaire une fraction biguanide et une autre de naphtoquinone, l'affinité aux protéines desquelles a été objectivée précédemment, on observe une diminution de la teneur globale en protéines (du filtrat rapporté au sérum témoin), diminution portant sur la teneur de l'albumine et sur le taux de la globuline principalement. Ainsi on observe une réduction de la surface totale correspondant aux protéines présentes de 11,5%. L'albumine subit une réduction de 10%, l' $\alpha$ -globuline et la  $\gamma$ -globuline restent sans changement, la  $\beta$ -globuline subit une réduction de la surface de 43%. (On remarquera que la  $\beta$ -globuline est souvent augmentée dans les états cancéreux – ainsi c'est le cas du myélome multiple, cancer du foie, etc.)

Ainsi l'essai électrophorétique à l'aide de l'appareil de TISELIUS a permis de mettre en évidence le fait qu'au cours de la synthèse d'un composé réalisant la jonction des groupements fonctionnels utiles, on ne s'est pas écarté des propriétés souhaitées, et l'affinité aux protéines a subsisté. (Voir Tableau page 121).

Mais toutes ces substances paraissent avoir une faible solubilité, ce qui peut peser sur leur valeur thérapeutique éventuelle. Dans ces conditions, les synthèses peuvent être tentées en partant d'un noyau non pas de naphtoquinone mais de benzo-quinone, par exemple les structures  $\alpha$ ,  $\beta$ , page 121, mais possibilité de cyclisation interne compliquant considérablement la synthèse; cyclisation entre fonction quinone et imine du type:

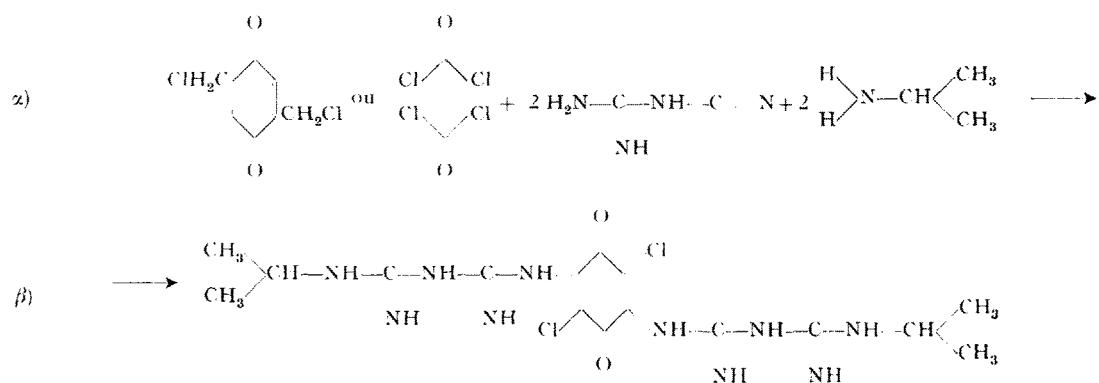


Ainsi, la recherche des anticancéreux de synthèse a été mise sur un canevas de chimie et de physique avec un objectif limité et réalisable (quoique parfois difficilement), celui de créer des substances déterminant dans l'organisme des conditions défavorables à une prolifération cellulaire.

### *Summary*

The recent successes in chemotherapy suggest that a solution of the same order should now be possible for

cancer. The cause of cancer being still unknown, the therapeutic action aimed at is the creation in the organism of conditions unfavorable for cell multiplication. Certain of the factors essential for cell growth, such as the hydrocarbons, have already been studied in this light. The author has demonstrated the possibility of influencing the high degree of hydration of tumor tissue by the use of substances capable of effecting a homogeneous distribution of the dispersed substances in the aqueous phase. Furthermore, it was proposed to influence



### Tableau

## Variations de la surface protéique par rapport au sérum témoin; déterminations électrophorétiques effectuées à l'aide de l'appareil de TISELIUS

	Surface protéique totale	Surface des fractions protéiques			
		Albumine	$\alpha$ -globuline	$\beta$ -globuline	$\gamma$ -globuline
Après addition à 5 cm <sup>3</sup> de sérum sanguin de 60 mg de N <sub>1</sub> -p-chlorophényl-N <sub>5</sub> -isopropylbiguanide dans 5 cm <sup>3</sup> d'eau	- 12%	- 9%	- 18%	- 34%	-
Après addition à 5 cm <sup>3</sup> de sérum sanguin de 2-méthyl-1:4-naphtoquinone à saturation	- 5%	- 7%	-	- 22%	-
Après addition à 5 cm <sup>3</sup> de sérum sanguin de N <sub>1</sub> (3-1'-chloréthyl-2-méthyl-1:4-naphtoquinone)-N <sub>5</sub> -diméthylbiguanide à saturation	- 11,5%	- 10%	-	- 43%	-

the protein repair accompanying cell multiplication by means of substances having an affinity for proteins. This was done to effect a condensation of protein elements before they reach the tumor, thus producing a return to the normal concentration of the free protein fraction, and, at the same time, a decrease in the turnover of these elements through the tumor. Electrophoretic measurements made with the TISELIUS apparatus have made it possible to follow protein affinity and to suggest the synthesis of compounds containing quinone and imine groups which may prove valuable in future investigations along these lines.

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Über die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas

Mit besonderer Berücksichtigung der blutzuckergesteuerten Insulinsekretion

Von H. MASKE<sup>1</sup>, München

Der Blutzucker wird im Wirbeltierorganismus konstant gehalten. Stärkere Abweichungen in der einen oder anderen Richtung bedingen Störungen der normalen Funktion. Einer der wichtigsten Faktoren zur Aufrechterhaltung der Blutzuckerkonstanz ist das Insulin. Das Wechselspiel zwischen Blutzuckerniveau und Sekretion des den Blutzucker senkenden Hormons ist seit langem Gegenstand der Diskussion. Im Laufe der Jahre wechselte die Ansicht über den Auslöser der Insulinsekretion mehrmals. Ein humoraler Mechanismus wurde von STAUB<sup>2</sup> und POLLAK<sup>3</sup> bereits 1921 bzw. 1923 vermutet. Den unmittelbaren Einfluss der Blutglukose auf die Insulinsekretion konnten GRAFE und MEYTHALER<sup>4</sup> als erste experimentell beweisen. GAYE<sup>5</sup>, FOGLIA und FERNANDEZ<sup>6</sup> zeigten am entnervten, homöotransplantierten Pankreas, dass dieser Einfluss ohne den Umweg über das Nervensystem ausgeübt wird. Zu derselben Zeit wiesen LA BARRE<sup>7</sup> und Mitarbeiter an Hand von komplizierten Tierversuchen eine unmittelbare Vaguswirkung auf die Insulinsekretion nach. Die inselspezifische Wirkung von Hypophysen-Vorderlappen-Injektionen (YOUNG<sup>8</sup>) fand ihre Aufklärung durch Untersuchungen insbesondere von LUKENS und Mitarbeitern<sup>9</sup> dahin-

gehend, dass HVL den Blutzucker erhöht und auf diesem Weg eine Insulinsekretion bis zur Erschöpfung und Zerstörung der  $\beta$ -Zellen erzwingt. Der unmittelbare Einfluss der Blutglukose auf die Inseln wurde von einer Reihe weiterer Autoren mit den verschiedensten Methoden bestätigt. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang der direkte Nachweis des vermehrt abgegebenen Insulins im Blut durch ANDERSON, 1953. Ohne Zweifel besitzt der Organismus die Möglichkeit, die Insulinsekretion auch über das Nervensystem zu beeinflussen; der unmittelbaren Wechselbeziehung zwischen Blutzucker und Inseln scheint jedoch eine grössere Bedeutung zuzukommen. Die dabei in den Inselzellen ablaufenden Vorgänge sind bisher nicht diskutiert worden. Es besteht auch keine Möglichkeit, Vergleiche mit anderen endokrinen Drüsen anzustellen, da über intrazelluläre Stoffwechselprozesse bei der Inkretabgabe so gut wie nichts bekannt ist. Neuere, zum Teil eigene Arbeiten über das Verhalten des in den Inseln histochemisch nachweisbaren Zinks und über die Natur der Inselzellgranula erlauben es, die intrazellulären Vorgänge bei der blutzuckergesteuerten Insulinabgabe auf der Basis der bekannten chemischen Beziehungen zwischen Insulin und Zink zu diskutieren.

Als Beweise für die inkretorische Natur der Inseln lassen sich die folgenden Tatsachen anführen: die Insulingewinnung aus dem Pankreas, insbesondere aus den isolierten Inseln verschiedener Knochenfische, die Diabetesentstehung nach der selektiven Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch Alloxan und die Beseitigung des Hyperinsulinismus durch Entfernung von Inseladenomen. Zahlreiche anatomische bzw. histologische Untersuchungen haben sich mit den mikroskopisch darstellbaren Veränderungen der Inseln unter den verschiedensten Stoffwechselbedingungen befasst<sup>1</sup>. Es zeigte sich, dass die sogenannten  $\beta$ -Zellen und das Insulin in ihrem Verhalten enge Beziehungen zeigen. Die Zellgranula besitzen ähnliche chemische Eigenschaften wie Insulin; sie sind im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Zellgranula in 70%igem Alkohol löslich und werden durch wässriges Chromsublimat gefällt<sup>2</sup>. Mehrfaches Hungern, kohlenhydratarme Kost und Insulininjektionen reduzieren sowohl die Zahl der  $\beta$ -Zellgranula als auch die Menge des aus der Drüse extrahierbaren Insulins<sup>3</sup>. An teilweise pankreatomierten Tieren wurde gezeigt, dass die Inseln des Restpankreas zu einer Leistungssteigerung befähigt sind, die ein Mehrfaches beträgt. Dasselbe zeigt sich im Verlauf von längerdaernden Kohlenhydratbelastungen der Versuchstiere durch Glukoseinfusionen und nach Anwendung von Insulinantagonisten, zum Beispiel ACTH oder Wachstumshormon. Allerdings besitzt die Leistungsfähigkeit der Inseln eine Grenze, nach deren Überschreitung es durch Überanstrengung zur Erschöpfung und anschliessend zu reversiblen oder irreversiblen Schäden der Inselzellen mit Funktionsstörungen im Sinne eines Diabetes kommt. Bei verschiedenen experimentellen Diabetesformen und beim menschlichen Diabetes von

<sup>1</sup> II. Medizinische Universitätsklinik München.

<sup>2</sup> A. STAUB, Biochem. Z. 118, 93 (1921).

<sup>3</sup> H. POLLAK, Ergebnisse inn. Med. 23, 337 (1923).

<sup>4</sup> E. GRAFE und F. MEYTHALER, Arch. exp. Path. Pharmak. 125, 181 (1927); 131, 80 (1928); 136, 360 (1928).

<sup>5</sup> R. GAYET, *Le Fonctionnement endocrinien du Pancréas et sa régulation sans le concours du système nerveux* (Masson, Paris 1928).

<sup>6</sup> V. G. FOGLIA und J. FERNANDEZ, C. r. séances Soc. biol. Buenos Aires 121, 355 (1936).

<sup>7</sup> J. LA BARRE, Arch. internat. 29, 227, 238, 257 (1927). – E. ZUNZ und J. LA BARRE, Arch. internat. Physiol. 29, 265, 281 (1927); 31, 162 (1929); C. r. Soc. Biol. 99, 631 (1928).

<sup>8</sup> F. G. YOUNG, Lancet 2, 372 (1937); Biochem. J. 32, 513 (1938).

<sup>9</sup> F. D. W. LUKENS und F. C. DOHAN, Science 92, 222 (1940). – F. D. W. LUKENS, F. C. DOHAN und M. W. WOLCOTT, Endocrinology 32, 475 (1943).

<sup>1</sup> Zusammenfassung der Literatur bei W. BARGMANN, *Handbuch mikroskopischer Anatomie*, 6. Bd., 2. Teil (J. Springer, Berlin 1939), – H. FERNER, *Das Inselsystem des Pankreas* (Thieme-Verlag, Stuttgart 1952).

<sup>2</sup> C. H. BEST, *On the Islets of Langerhans Experimental Diabetes*, A. Symposium (Blackwell, Oxford 1954).

<sup>3</sup> S. ST. BARRON und D. STATE, Arch. Pathol. 48, 297 (1949). – C. H. BEST, R. E. HAIST und J. H. RIDEOUT, J. Physiol. 97, 107 (1939). – C. H. BEST und R. E. HAIST, J. Physiol. 100, 142 (1941). – G. GOMORI, N. B. FRIEDMANN und D. W. CALDWELL, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 41, 567 (1939). – S. T. NERENBERG, Amer. J. Clin. Path. 23, 340 23, 999 (1953). – C. A. WOERNER, Anat. Rec. 71, 33 (1938); 75, 91 (1939).