

denen Natriumglyzinat- oder physiologische Kochsalzlösung im demselben Volumen verabfolgt wurde, verglichen.

Einfluss des Chlortetrazyklins auf den Ascorbinsäuregehalt der Rattennebenieren

	Anzahl der Tiere	Ascorbinsäuregehalt mg%	%
Physiologische Kochsalzlösung 0,25 ml/100 g intraperitoneal	6	340 (283,5–396,5)	100
Natriumglyzinat 2,5 mg/100 g intraperitoneal in 0,25 ml . .	7	343 (308,7–377,3)	100,8
Chlortetrazyklin 2,5 mg/100 g intraperitoneal in 0,25 ml . .	7	233 (160,2–305,8)	69,6
Physiologische Kochsalzlösung 1,0 ml/100 g intraperitoneal .	9	333 (277,6–388,4)	100
Natriumglyzinat 10,0 mg/100 g intraperitoneal in 1,0 ml . .	10	312 (266,1–357,9)	93,1
Chlortetrazyklin 10,0 mg/100 g intraperitoneal in 1,0 ml . .	9	192 (156,2–227,8)	58

Die Zahlen in Klammern bedeuten die 95%-Sicherheitsgrenzen der Mittelwerte.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, verursachen beide angewandten Dosen gegenüber den Kontrollgruppen eine statistisch gesicherte Verringerung des Ascorbinsäuregehaltes der Rattennebenieren.

Wir halten dies für eine experimentelle Unterstützung der Annahme³, dass der Einfluss des Chlortetrazyklins auf das adrenohypophysäre System in seiner therapeutischen Wirkung eine gewisse Rolle spielt.

V. SOBEK und I. JANKŮ

Pharmakologisches Institut der kinderärztlichen Fakultät der Karls-Universität und Pharmakologisches Laboratorium des Chemischen Institutes der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag, den 8. Dezember 1956.

Summary

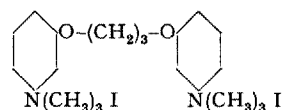
It has been stated that chlortetracyclin causes a depletion of ascorbic acid in rat adrenals.

³ E. OZAWA, J. Antibiot. (Japan) A8, 212 (1955).

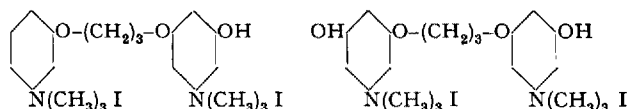
Propriétés antiacétylcholinestérasiques du diiodométhylate de bis-(diméthylamino-3-phénoxy)-1-3 propane, de ses dérivés phénoliques et des esters carbamiques correspondants

Dans de récents travaux, l'un de nous, en collaboration avec KRUCKER¹, puis avec BAGOT², a synthétisé un

groupe de cinq substances douées d'activités antiacétylcholinestérasiques élevées. Ces composés, dont les désignations courtes et les formules développées sont rassemblées ci-après, sont tous caractérisés par la présence de deux fonctions ammonium quaternaires et se distinguent les uns des autres de la façon suivante: le corps le plus simple, le 2842 CT ne possède pas d'autres groupements fonctionnels que les groupes ammonium quaternaires; les 3443 CT et 3116 CT comportent respectivement une et deux fonctions phénoliques; les 3152 CT et 3113 CT enfin, sont respectivement le monocarbamate et le dicarbamate des phénols préparés.

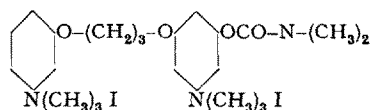


2842 CT

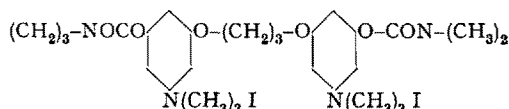


3443 CT

3116 CT



3152 CT



3113 CT

Les essais biochimiques réalisés, avec des hématies de chien ou d'homme comme préparations enzymatiques, ont montré que le 2842 CT possède un pouvoir inhibiteur important mais que ses dérivés phénoliques et carbamiques sont beaucoup plus efficaces². LEVIN et JANDORF³ ont, sans avoir connaissance de nos résultats, confirmé que les concentrations inhibitrices 50% des 3152 CT et 3113 CT étaient de l'ordre de 1×10^{-8} avec des hématies humaines, comme nous l'avions observé avec des hématies de chiens².

Les expériences décrites dans ce travail ont été entreprises pour préciser, par des comparaisons plus quantitatives que celles réalisées jusqu'à présent, les rôles respectifs des diverses fonctions caractérisant ce groupe de substances. En effet, les activités antiacétylcholinestérasiques des phénols et des carbamates sont très voisines et l'on pouvait se demander si les dérivés carbamiques n'agissaient pas, en réalité, en libérant les dérivés phénoliques correspondants.

Nos expériences ont été effectuées avec la méthode classique de WARBURG-AMMON; la préparation enzymatique était constituée par des hématies humaines (concentration terminale $1/300$); le substrat était du chlorhydrate d'acétyl- β -méthylcholine (concentration terminale 0,03 M); le liquide de dilution du bicarbonate de sodium 0,025 M; le mélange gazeux comportait 95% de

¹ A. FUNKE et W. KRUCKER, Bull. Soc. chim. France 20, 744 (1953).

² A. FUNKE, J. BAGOT et F. DEPIERRE, C. r. Acad. Sci. 239, 329 (1954).

³ A. P. LEVIN et B. J. JANDORF, J. Pharmacol. 113, 206 (1955).

N₂ et 5% de CO₂. En général le mélange d'enzyme et d'inhibiteur était placé dans la cupule centrale; la solution de substrat, dans le diverticule latéral. Dans les essais d'inhibition sans incubation préalable, les solutions d'inhibiteurs et de substrat étaient toutes deux placées dans la cupule centrale, et la suspension d'hématies, dans le diverticule latéral. Pour les essais de lavage, on incubait des hématies (concentration 1/12) avec l'inhibiteur pendant 2 h; chaque lavage était réalisé avec une proportion constante (9:1) de solution ClNa à 9‰. Chacun des résultats publiés et chacun des points portés sur les figures représentent la moyenne de, au moins, deux expériences comportant chacune deux déterminations en duplicata.

1° *Influence de l'incubation préalable.* Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le Tableau I. On y vérifie le contraste existant entre le 2842 CT, très rapidement fixé sur l'enzyme, et les deux dérivés carbamiques pour lesquels l'inhibition ne se développe qu'avec une latence appréciable⁴. Les deux dérivés phénoliques se comportent comme le 2842 CT; une inhibition importante est d'emblée réalisée et la progression de l'inhibition, dans l'heure qui suit le mélange de l'enzyme avec l'inhibiteur, est très modérée et de l'ordre des erreurs expérimentales. La prolongation de l'incubation, jusqu'à 2 et même 4 h, n'entraîne pas de modifications supplémentaires importantes, tout au moins dans le cas des concentrations étudiées.

Tableau I

Temps d'incubation en minutes	Influence de l'incubation sur les inhibitions				
	2842 CT	3152 CT	3113 CT	3443 CT	3116 CT
0	81	14	6,5	74	71
60*	82	80	74	79	76

Les inhibitions (en %) ont été déterminées entre les 3^e et 13^e min après l'addition du substrat: celui-ci était ajouté, en même temps que l'inhibiteur, à la suspension d'hématies ou bien à un mélange d'enzyme et d'inhibiteur préalablement incubé.

Les concentrations terminales d'inhibiteur ont été choisies telles que des inhibitions similaires fussent réalisées après incubations: elles étaient de 3×10^{-6} pour les 2842 CT; de 8×10^{-9} pour les autres corps. Concentrations terminales: hématies 1/36; acétyl β -méthylcholine, 0,03 M.

* Ce temps d'incubation est de 90 min pour le 3113 CT.

2° *Activités inhibitrices.* Ces activités ont été déterminées avec des mélanges enzyme-inhibiteur préalablement amenés à l'équilibre par une incubation de 1 h, pour le 2842 CT, le 3443 CT, le 3116 CT et le 3152 CT, et de 1 h 30 min pour le 3113 CT. Les deux composés carbamiques ont une activité semblable (Fig. 1); il en est de même pour les composés phénoliques (Fig. 2). L'activité de ces derniers se rapproche beaucoup de celle des deux uréthanes, toutefois ils sont légèrement moins efficaces pour les concentrations inférieures à 5×10^{-9} M, et, en moyenne, très légèrement plus pour les concentrations supérieures (Fig. 3). Les Cl-50 sont, respectivement, de 8×10^{-7} pour le 2842 CT, de $1,5 \times 10^{-9}$ pour les 3152 CT et 3113 CT (dérivés carbamiques) et de $3,5 \times 10^{-9}$ pour le 3443 CT et le 3116 CT (dérivés phénoliques). Parmi ces différents composés, le 3113 CT, c'est-à-dire le corps porteur de deux fonctions uréthanes, pré-

sente un net phénomène de «slow displacement», les inhibitions déterminées entre les 23^e et 33^e min qui suivent l'addition du substrat au mélange enzyme-

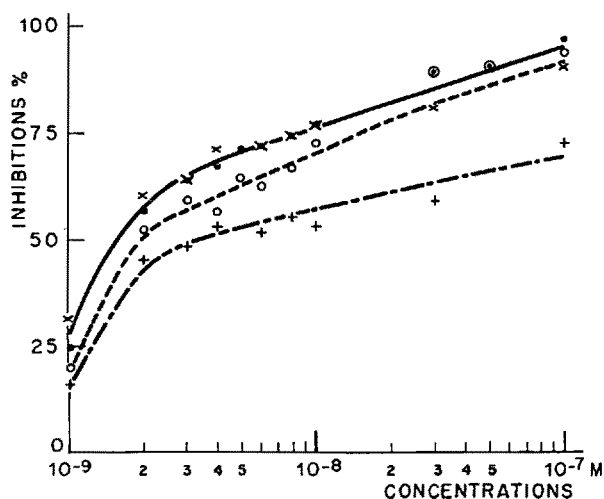


Fig. 1. Activités inhibitrices des deux composés carbamiques (3152 CT et 3113 CT).

—●— 3152 CT —×— 3113 CT:
Inhibitions déterminées entre les 3^e et 13^e min

---○--- 3152 CT ---+--- 3113 CT:
Inhibitions déterminées entre les 23^e et 33^e min après l'addition du substrat au mélange enzyme-inhibiteur

inhibiteur étant inférieures à celles déterminées entre les 3^e et 13^e min (Fig. 1). Dans le cas du 3152 CT (une fonction uréthane), ce phénomène est douteux (Fig. 1); il est absent pour les dérivés phénoliques (Fig. 2).

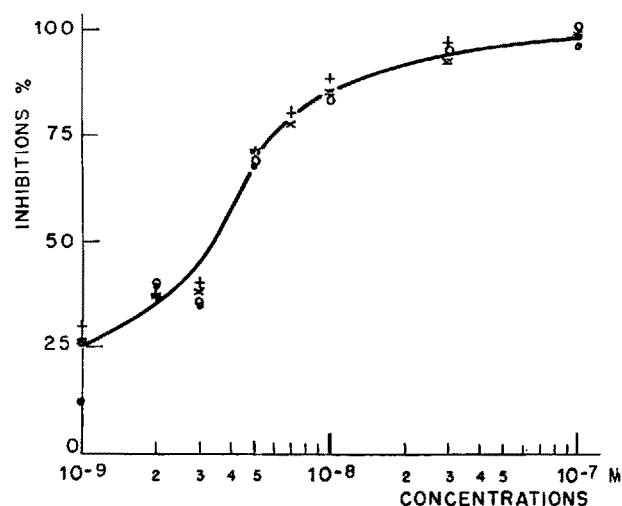


Fig. 2. Activités inhibitrices des deux composés phénoliques (3443 CT et 3116 CT).

● 3443 CT × 3116 CT:

Inhibitions déterminées entre les 3^e et 13^e min

○ 3443 CT + 3116 CT:

Inhibitions déterminées entre les 23^e et 33^e min après l'addition du substrat au mélange enzyme-inhibiteur.

3° *Réversibilité de l'inhibition.* Les résultats sont consignés dans le Tableau II. On y voit, en confirmation des observations de LEVIN et JANDORF³ que l'inhibition par

⁴ A. P. LEVIN et B. J. JANDORF, J. Pharmacol. 113, 206 (1955). — F. DEPIERRE et A. FUNKE, C. r. Acad. Sci. 249, 370 (1954).

le 2842 CT rétrocede facilement, contrairement à celle obtenue avec les dérivés uréthanes. D'autre part, l'inhibition réalisée avec les dérivés phénoliques est aussi peu réversible que celle obtenue avec les dérivés carbamiques, le complexe formé par le dérivé diphenolique et

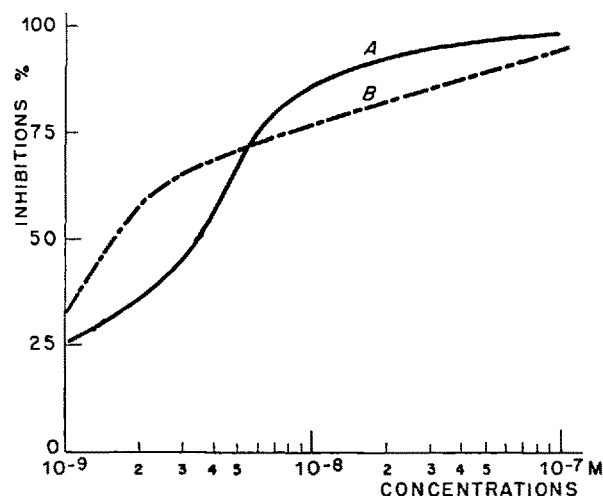


Fig. 3. Comparaison entre les activités inhibitrices des composés phénoliques. Les inhibitions reportées sont celles déterminées entre les 3^e et 13^e min après l'addition du substrat au mélange enzyme-inhibiteur. A : courbe commune aux composés phénoliques, B : courbe commune aux composés carbamiques.

l'enzyme se dissocie même moins aisément par lavage que celui formé par le dérivé dicarbamique. Si l'on tient compte de la rapidité avec laquelle est réalisée l'inhibition par ces substances phénoliques, on constate qu'il n'y a pas de relation directe entre la vitesse de formation du complexe enzyme-inhibiteur et sa dissociation par lavage, contrairement à ce que LEVIN et JANDORF³ avaient pensé pour le 2842 CT et ses dérivés carbamiques.

Tableau II. Influence des lavages sur les inhibitions

Inhibiteurs	0	1	2	3	5
2842 CT.	75	29	4,5	0	
3152 CT.	84	69		55	60
3113 CT.	78	51		37	31
3443 CT.	80	64		57	50
3116 CT.	81	66		60	52

Les inhibitions (en %) ont été déterminées entre les 3^e et 13^e min après l'addition du substrat. Le substrat était ajouté à la suspension globulaire 30 min après le dernier lavage dans le cas du 2842 CT; 120 min pour les autres substances.

Concentrations terminales: hématies 1/36, acétyl β -méthylcholine 0,03 M; inhibiteurs (avant lavage): 2842 CT, $1,6 \times 10^{-6}$ M; 3443 CT et 3116 CT, 8×10^{-9} M; 3152 CT et 3113 CT, 4×10^{-8} M.

En somme, la présence d'une ou deux fonctions phénoliques ou carbamiques se traduit par des accroissements importants et très comparables de l'activité inhibitrice vis-à-vis des acétylcholinestérases et de la stabilité des complexes enzyme-inhibiteurs. Ce qui distingue essentiellement les dérivés phénoliques et les dérivés carbamiques est leur rapidité de fixation sur l'en-

zyme. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse émise plus haut selon laquelle les dérivés carbamiques agiraient par l'intermédiaire des composés phénoliques, le temps de latence de l'inhibition par les carbamates pouvant représenter, *a priori*, le temps nécessaire à leur hydrolyse en phénol. Toutefois l'existence d'une zone de concentration où les dérivés carbamiques sont légèrement plus actifs que les dérivés phénol, de même que la présence d'un phénomène de «slow displacement» pour le dérivé dicarbamique, tendent à montrer que les fonctions carbamates ont également un rôle propre. Ce rôle apparaît nettement dans le cas, non plus des acétylcholinestérases, mais des pseudocholinestérases vis-à-vis desquelles les dérivés uréthanes sont beaucoup plus efficaces que les composés phénoliques⁵.

Enfin, si l'on tient compte de la spécificité de ces substances⁵, on constate que cette série de composés comporte des inhibiteurs appartenant à trois catégories distinctes:

1° Le 2842 CT, antiacétylcholinestérasique sélectif, que sa rapidité de fixation et de dissociation apparente étroitement à d'autres antiacétylcholinestérasiques spécifiques dont les seuls groupements fonctionnels sont aussi des groupes basiques⁶.

2° Les dérivés carbamiques, dérivés peu sélectifs dont l'intérêt réside dans leur haute activité et dans leur réversibilité nettement inférieure à celle des uréthanes le plus souvent utilisés (néostigmine, éserine).

3° Les dérivés phénoliques qui, comme le 2842 CT, sont des antiacétylcholinestérasiques sélectifs; ils présentent la caractéristique originale, pour de tels inhibiteurs de former des complexes relativement peu dissociables.

J. JACOB, F. DEPIERRE et A. FUNKE

Laboratoire de Pharmacologie, Service de Chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur, Paris, le 19 novembre 1956.

Summary

The *in vitro* anti-acetylcholinesterase properties of bis-(dimethylamino-3-phenoxy)-1-3 propane dimethiodide (2842 CT) of two phenolics derivatives (3443 CT and 3116 CT) and of the two corresponding carbamic esters (3152 CT et 3113 CT) have been compared using human red blood corpuscles as enzyme source; under specified conditions, the CI-50 are respectively 8×10^{-7} M for 2842 CT, 3.5×10^{-9} for the two phenolic compounds, and 1.5×10^{-9} for the carbamic esters. The potencies of these phenols are very close to those of the carbamates, being a bit higher or lower depending on the concentration of the inhibitor and on the time of the reading.

The two phenolic compounds, like 2842 CT, react readily with the enzyme contrarily to the carbamic esters which combine slowly. On the other hand the inhibition by the phenolic derivatives is as stable against washing as that by the carbamates. The carbamates, but not the phenols, show the slow displacement phenomenon.

Some of these characteristics are compatible with the hypothesis that carbamic compounds could act through liberated phenolic functions but others indicate that carbamic groups have a role of their own.

⁵ F. DEPIERRE et A. FUNKE, C. r. Acad. Sci. 249, 370 (1954).

⁶ J. JACOB, Arch. int. Pharmacodyn. 101, 446 (1955).