

pounds linearity. The highest concentrations were found in the lungs. This finding, as far as LSD is concerned, accords with earlier observations in mice (experiments with  $C^{14}$ -labelled LSD<sup>23</sup>) and cats (fluorimetric estimation<sup>22</sup>). The levels of LSD and Deseril in blood and muscle are about the same but definitely lower than in the lungs. In the brain, however, the two compounds behave quite differently. Whereas in the case of LSD the brain values closely resemble those found in muscle and blood, much smaller amounts of Deseril could be detected in this tissue. This difference in the brain-concentration is probably due to different degrees of penetration across the BBB.

More significant than absolute values in such distribution-studies are the ratios: tissue/blood, particularly if different drugs are to be compared at different dose-levels. In Table I the values for these ratios are summarized. LSD and Deseril accumulate 6 to 10 times in the lung and the muscle/blood ratio figures around 1.

With regard to the brain, the ratios vary considerably: those of LSD range from 0.68 to 1.63, those of Deseril only around 0.2. Assuming a relatively free passage of LSD across the BBB into the brain, values for Deseril expressed as a percentage of those for LSD are of interest (Table II). Only 3 and 10 mg/kg are considered in this Table, because after the injection of 1 mg/kg Deseril, the

brain-concentration is in a range where the accuracy of the fluorimetric method is doubtful. On the other hand, 30 mg/kg LSD is not included because of its toxicity. As the figures show, the distribution of Deseril in lung and muscle is similar to that of LSD, whereas only 12.0% and 14.6% respectively are found in the brain.

*Discussion.* The distribution and fate of LSD after parenteral administration in mice have been investigated in our laboratories with various methods<sup>23,24</sup>. Using a bioassay (serotonin-antagonistic effects on the isolated rat uterus), as well as  $C^{14}$ -labelled LSD, it was shown that, as early as 10–15 min after intravenous injection, a tissue-equilibrium, i.e. a maximum of tissue concentration, is obtained. In preliminary experiments, using the fluorimetric method, it was observed that the distribution of Deseril in the rat is as rapid as that of LSD. An analysis of the distribution of each substance at various doselevels and in various organs, therefore seemed of interest. The tissue-concentrations plotted in the Figure confirm, by and large, the hypotheses: they are dose-dependent and, as far as LSD is concerned, accord with earlier results.

The concentration ratio tissue/blood given in Table I and the distribution ratio of Deseril in relation to LSD in Table II, show almost identical values in lung and muscle. From our findings it becomes obvious that Deseril penetrates into peripheral tissues. In contrast to this, only about 13% of the amount of Deseril to be expected reaches the brain. Since Deseril does not elicit LSD-like symptoms, even when given in doses 8 times greater than those of LSD, the difference in the brain levels obtained does not explain why Deseril lacks central effects. Our results contribute to the analysis of the hallucinogenic activity of LSD itself, only in so far as they add further support to the view that it is structure-specific. On the other hand, however, they show that with regard to structure/activity relationships such factors have to be taken into account in the comparison of peripheral and central effects.

*Zusammenfassung.* Bei Ratten wurde die Verteilung von LSD und Deseril 20 min nach intravenöser Verabreichung fluorimetrisch bestimmt. Auf Grund der ermittelten Quotienten: Gewebe/Blut ergab sich, dass beide Lysergsäurederivate ein gleiches Verteilungsschema in Lunge und Muskel, d. h. in peripheren Organen aufweisen. Im Gegensatz hierzu konnten von Deseril im Gehirn nur ca. 13% des zu erwartenden Wertes nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieses Befundes wird diskutiert.

W. DOEPFNER

Medizinisch-Biologische Forschungsabteilung der Sandoz A.G., Basel (Switzerland), April 6, 1962.

Tab. I. Tissue/blood ratio of LSD and Deseril at various dose levels 20 min after i.v. injection

Tissue/Blood	Dose mg/kg i.v.			
	1	3	10	30
Tissue/Blood ratio of LSD				
Lung/Blood	5.88	10.00	7.47	
Muscle/Blood	0.66	1.06	1.58	
Brain/Blood	0.68	1.08	1.63	
Tissue/Blood ratio of Deseril				
Lung/Blood	7.0	8.05	7.45	6.61
Muscle/Blood	1.16	1.26	1.31	1.30
Brain/Blood	0.25	0.16	0.20	0.25

Tab. II. % tissue concentration of Deseril expressed as a percentage of that of LSD calculated from the tissue/blood ratios of Table I

Tissue	Dose mg/kg	
	3	10
Lung	80	100
Muscle	119	83
Brain	14.6	12

<sup>23</sup> A. STOLL, E. ROTHLIN, J. RUTSCHMANN, and W. R. SCHALCH, Exper. 11, 396 (1955).

<sup>24</sup> U. LANZ, A. CERLETTI, and E. ROTHLIN, Helv. physiol. Acta 13, 207 (1955).

### Action répressive de l'oxygène sur la biosynthèse de la fumarique- réductase d'*Aerobacter aerogenes*

L'une des principales fonctions physiologiques des réductases bactériennes est de permettre à de nombreuses

espèces anaérobies facultatives d'utiliser différents accepteurs d'hydrogène minéraux ou organiques. Ces enzymes d'oxydoréduction n'interviennent pas dans le métabolisme oxydatif aérobie mais jouent par contre un rôle essentiel dans le métabolisme oxydatif anaérobique. Nous avons précédemment établi que l'oxygène atmosphérique réprime la biosynthèse de la nitrate-réductase chez *Aero-*

bacter aerogenes<sup>1,2</sup> et chez plusieurs espèces bactériennes anaérobies facultatives<sup>3</sup>. D'autre part, nous avons observé que trois réductases distinctes intervenant dans la réduction du nitrate, du nitrite et de l'oxyde nitreux en azote moléculaire, ne sont point synthétisées par les cultures aérobies de *Micrococcus denitrificans*<sup>4,5</sup>. On pouvait se demander si la fumarique-réductase qui rend possible l'utilisation du fumarate comme accepteur physiologique d'électrons par les cultures anaérobies d'*A. aerogenes*<sup>6</sup>, est également soumise à l'action répressive de l'oxygène atmosphérique. Dans un travail très important, PECK, SMITH et GEST<sup>7</sup> ont extrait l'enzyme de *Micrococcus lactilyticus* et montré que l'on peut mesurer son activité en présence d'hydrogène. Une méthode inspirée du même principe nous a permis d'étudier la biosynthèse de la fumarique-réductase d'*A. aerogenes*.

**Matériel et méthodes.** Nous avons utilisé la souche LIII-I d'*A. aerogenes* provenant de la collection du Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut Pasteur. Le milieu de base employé a la composition suivante:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{I2 H}_2\text{O}$ , 3,575 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,98 g;  $\text{MgSO}_4$ , 0,03 g;  $\text{FeSO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$ , traces;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g; eau distillée, 1000 ml; pH 7. Les cultures dépourvues de fumarate contiennent 2 g de glucose par litre. Les autres cultures contiennent 0,5 g de glucose et 1 g d'acide fumarique par litre. Dans tous les cas, les solutions de glucose et d'acide fumarique sont stérilisées à part et ajoutées au moment de l'ensemencement. Les solutions d'acide fumarique sont neutralisées par la soude. Les cultures aérobies sont réalisées dans des fioles à toxine agitées. Les cultures anaérobies sont placées dans des flacons cylindriques profonds ou dans des ballons sous vide. On centrifuge les bactéries après 20 h d'incubation à 32°. On ajoute du chloramphénicol (25 µg/ml) aux cultures aérobies pour éviter qu'elles ne synthétisent la fumarique-réductase pendant la centrifugation. Nous avons vérifié que cet antibiotique n'exerce aucune action inhibitrice sur l'enzyme. Les extraits sont préparés par traitement des cellules fraîches pendant 5 min dans un appareil Raytheon. Ils sont séparés des débris cellulaires par centrifugation (15 000 t/min; 20 min). Leur teneur en azote protéique est estimée par micro-Kjeldahl. La densité des suspensions cellulaires est déterminée après dilution convenable, par mesure de la densité optique à l'aide d'un photocalorimètre Blet muni d'un filtre bleu-vert. L'acide succinique formé est dosé par la méthode manométrique classique de UMBREIT, BURRIS et STAUFFER<sup>8</sup>; après extraction par l'éther.

Les activités des suspensions cellulaires et des extraits sont mesurées par la méthode manométrique de Warburg, à 37°, dans des coupes coniques contenant 3 ml de liquide. Le tampon phosphates pH 7, le benzyl-viologène (100 µg), les bactéries ou les extraits sont placés dans la coupe. La solution de fumarate de sodium (10 µmoles) placée dans le diverticule latéral est ajoutée au temps 0. Les systèmes destinés à la mesure de l'activité des extraits contiennent 0,2 ml d'une préparation brute d'hydrogénase obtenue par traitement sonique d'une suspension cellulaire de *Desulfovibrio desulfuricans*. Les manomètres sont remplis d'hydrogène. On commence l'expérience lorsque le contenu des coupes a pris la coloration violette caractéristique du benzyl-viologène réduit. Les  $-\text{QH}_2$  sont calculés à partir des pentes à l'origine des courbes représentant la consommation de  $\text{H}_2$  en fonction du temps (Figure 1). Ils sont exprimés en  $\text{mm}^3$  de gaz (conditions normales) consommés en 1 h par mg de bactéries (poids sec) ou par mg d'azote protéique pour les extraits. L'activité des cellules et des extraits représentée par V est déduite du  $-\text{QH}_2$ . Elle est donnée en µmoles d'acide fumarique réduites en 1 h par mg de bactéries ou par mg d'azote protéique pour les extraits.

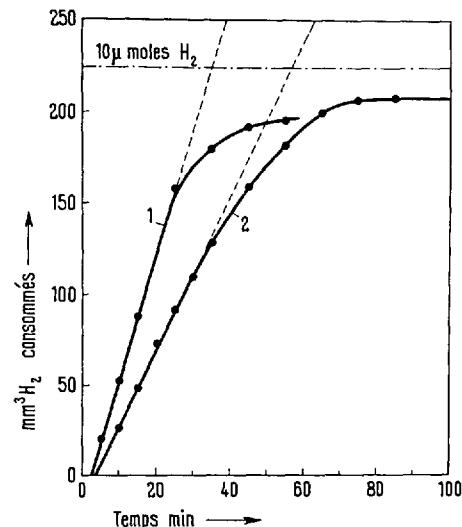
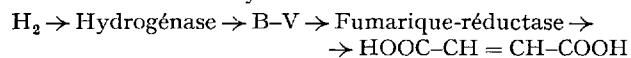


Fig. 1. Consommation d'hydrogène par une suspension cellulaire et un extrait provenant de cultures anaérobies sur milieu à base de fumarate. Conditions expérimentales: tampon phosphates pH 7; benzyl-viologène, 100 µg; fumarate de sodium, 10 µmoles; volume liquide, 3 ml; phase gazeuse, hydrogène; température, 37°. La solution de fumarate placée dans le diverticule latéral est ajoutée au temps 0. Courbe 1: système contenant 1,63 mg de bactéries. Courbe 2: système contenant 0,2 ml d'hydrogénase et 0,015 ml d'extract d'*A. aerogenes* (0,0525 mg d'azote protéique).

**Résultats expérimentaux.** Nous avons observé que les suspensions cellulaires provenant de cultures anaérobies ne consomment pas l'hydrogène en présence de fumarate mais acquièrent cette propriété lorsqu'on leur ajoute une faible quantité de benzyl-viologène (courbe 1, Figure 1). L'expérience précédente établit que les bactéries cultivées en l'absence d'oxygène synthétisent l'hydrogénase et la fumarique-réductase mais sont dépourvues d'un ou plusieurs transporteurs d'électrons nécessaires au couplage physiologique des deux enzymes. Il est intéressant de noter qu'une situation semblable se présente dans le cas de la nitrate-réductase du même organisme<sup>9</sup>. D'une manière générale, le benzyl-viologène réalise un couplage chimique entre les réductases bactériennes et l'hydrogénase. Sur le schéma suivant figure le trajet suivi par les électrons dans notre système:



Les extraits provenant de cultures anaérobies catalysent aussi la réduction de l'acide fumarique aux dépens de l'hydrogène en présence de benzyl-viologène (courbe 2,

<sup>1</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Biochim. biophys. Acta 48, 218 (1961).

<sup>2</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Nature 191, 879 (1961).

<sup>3</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, C. R. Acad. Sci. 252, 2294 (1961).

<sup>4</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Biochim. biophys. Acta 52, 386 (1961).

<sup>5</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Ann. Inst. Pasteur 101, 418 (1961).

<sup>6</sup> P. McPHERDRAN, B. SOMMER et E. C. C. LIN, J. Bact. 81, 852 (1961).

<sup>7</sup> H. D. PECK, O. H. SMITH et H. GEST, Biochim. biophys. Acta 25, 142 (1957).

<sup>8</sup> W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER, *Manometric techniques*, troisième édition (Ed. par Burgess Publishing Co., Minneapolis), p. 202.

<sup>9</sup> F. PICHINOTY et J. C. SENEZ, Biochim. biophys. Acta 35, 537 (1959).

Figure 1). Afin d'éviter que le transfert des électrons soit limité par la première étape de la chaîne, nous avons ajouté aux systèmes contenant les extraits, une préparation brute d'hydrogénase très active obtenue à partir d'une de culture de bactéries sulfato-réductrices. Précisons que cette opération devient indispensable lorsqu'on mesure l'activité des extraits de cultures aérobies qui sont totalement dépourvus d'hydrogénase<sup>10</sup>. Dans les conditions expérimentales ainsi définies, le facteur qui limite l'activité des systèmes est la réductase puisque la vitesse de consommation de  $H_2$  varie proportionnellement à la quantité d'extrait d'*A. aerogenes* (Figure 2). Dans les calculs, il est nécessaire de déduire la faible activité fumarique-réductase de l'extrait de *D. desulfuricans* dont la valeur est fournie par l'ordonnée du point d'intersection de la courbe avec l'axe vertical (Figure 2). Un chauffage très bref à 100° provoque une disparition complète de l'activité de de l'extrait d'*A. aerogenes*, ce qui confirme la nature enzymatique de la réaction étudiée. Avec la concentration de fumarate utilisée ( $3,33 \cdot 10^{-3} M$ ), la réductase est saturée par son substrat: les courbes 1 et 2 de la Figure 1 sont linéaires pendant la majeure partie de l'expérience. La réduction d'une  $\mu$ mole d'acide fumarique exige 0,9  $\mu$ mole de  $H_2$  et conduit à la formation de 0,85  $\mu$ mole d'acide succinique; aux erreurs expérimentales près, nos bilans correspondent à la réaction:

$H_2 + HOOC-CH=CH-COOH = HOOC-CH_2-CH_2-COOH$

Nous avons vérifié que l'enzyme d'*A. aerogenes* est beaucoup moins sensible à l'action inhibitrice du malonate que la succinique-déshydrogénase de muscle cardiaque: on observe seulement une baisse d'activité de 35% dans des conditions ([malonate])/[fumarate] = 20 où la déshydrogénase est complètement inhibée. D'autre part, la consommation de  $H_2$  n'est pas modifiée en présence d'une concentration élevée de succinate ([succinate])/[fumarate] = 20). Tous le résultats précédents suggèrent que l'activité fumarique-réductase d'*A. aerogenes* n'est pas due à une succinique-déshydrogénase fonctionnant en sens inverse. Ils confirment les observations de PECK, SMITH et GEST<sup>7</sup> réalisées avec un organisme différent. Nous pensons donc avec ces derniers auteurs qu'il est justifié de désigner par le terme fumarique-réductase l'enzyme responsable de la réduction du fumarate en succinate.

Comparons maintenant les activités des cellules et des extraits provenant de cultures aérobies et anaérobies sur

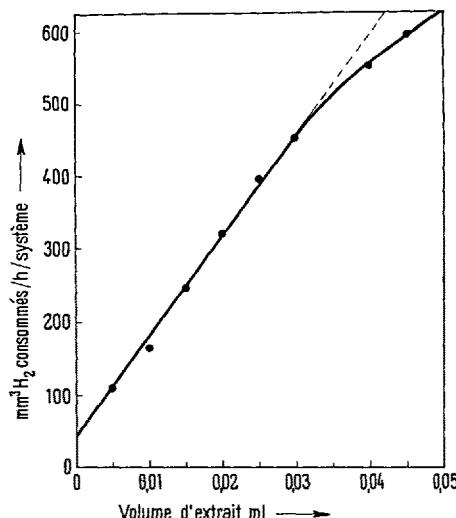


Fig. 2. Vitesse de consommation de l'hydrogène en fonction de la quantité d'extrait d'*A. aerogenes*. Conditions expérimentales identiques à celles de la Figure 1.

des milieux synthétiques glucosés avec et sans fumarate. Les résultats groupés sur le Tableau indiquent que les cultures anaérobies ne synthétisent une quantité élevée d'enzyme qu'en présence de fumarate. Puisque les cultures anaérobies peuvent vraisemblablement former de l'acide fumarique par fermentation, il est difficile de savoir si leur faible activité de base est réellement due à une synthèse constitutive. Quoi qu'il en soit, la fumarique-réductase présente bien un caractère inducible chez *A. aerogenes*. Un fait essentiel ressort de l'examen du Tableau: les cultures aérobies réalisées sur des milieux contenant du fumarate présentent toujours une activité extrêmement faible. Nous nous sommes assurés que l'enzyme est parfaitement stable en aérobiose, c'est-à-dire qu'il ne peut subir une inactivation irréversible au contact de l'oxygène: un extrait actif conserve son activité après 4 h d'aération. D'autre part, il a été vérifié que l'addition d'un volume élevé d'un extrait de culture aérobiose ne modifie point l'activité d'un extrait de culture anaérobiose. Cette dernière expérience permet d'écartier l'hypothèse suivant laquelle l'inactivité des cultures aérobies serait due à l'accumulation intracellulaire d'un inhibiteur de la fumarique réductase. Nous sommes par conséquent en mesure de conclure que l'oxygène atmosphérique réprime la biosynthèse de l'enzyme. Dans les cultures aérobies sur fumarate, le taux de répression est de 96%. Il est plus faible et atteint une valeur proche de 81% dans les cultures aérobies dépourvues d'inducteur. A l'aide d'une technique de mesure basée sur l'emploi des flavines libres, JACOBS et VANDEMARK<sup>11</sup> ont également observé que les cultures aérobies de *Streptococcus faecalis* présentent une activité beaucoup plus faible que les cultures anaérobies. Il est probable que ces derniers résultats s'expliquent encore par l'action répressive de l'oxygène. Notons pour terminer que LIN<sup>12</sup> a récemment démontré l'existence d'un phénomène semblable chez une autre souche d'*A. aerogenes*.

Influence des conditions de culture sur la formation de la fumarique-réductase. On donne dans chaque cas les résultats de deux expériences

	Cultures sans fumarate		Cultures avec fumarate	
	aérobies	anaérobies	aérobies	anaérobies
-QH <sub>2</sub> , cellules	0	0	37	51
V, cellules	0	0	1,6	2,3
-QH <sub>2</sub> , extraits	51	49	290	207
V, extraits	2,3	2,2	13	9,3
			107	94
			2050	3900
			5	4
			92	174

**Summary.** The cells obtained from anaerobic cultures of *A. aerogenes* contain both a hydrogenase and a fumaryl reductase, but lack one or several electron transporters necessary for the coupling of the two enzymes. It is possible to measure the fumaryl reductase activity of the extracts in the presence of hydrogen, hydrogenase and benzyl viologen, using the Warburg manometric technique. In anaerobic cultures the reductase is an inducible enzyme. In aerobic cultures its formation is strongly repressed by atmospheric oxygen.

F. PICHINOTY et G. COUDERT

Laboratoire de Chimie Bactérienne, Centre National de la Recherche Scientifique, C. R. S. I. M., Marseille (France), le 20 mars, 1962.

<sup>10</sup> F. PICHINOTY, résultats inédits.

<sup>11</sup> N. J. JACOBS et P. J. VANDEMARK, J. Bact. 79, 532 (1960).

<sup>12</sup> E. C. C. LIN, communication personnelle.