

oxygenated steroids (cortisol, cortisone, corticosterone, 11-dehydrocorticosterone). Though the effective 11 $\beta$ -hydroxylation inhibiting concentration of Su-4885 could depend on the substrate, our observations regarding the blockage of the 19-hydroxylation are supported by the findings of GRANT<sup>14</sup> and GRIFFITHS<sup>15</sup>. A more direct approach was studied using 4-C<sup>14</sup>-corticosterone as precursor. A relatively small but significant transformation of corticosterone into 19-hydroxycorticosterone and aldosterone was shown to occur in the control experiments. Both transformations were strongly inhibited by 50–100  $\mu$ g of Metopirone.

Our *in vivo* experiments in rats seem to confirm that Su-4885 has strong additional inhibiting properties regarding aldosterone formation and 18-hydroxylation. Inhibition was observed with 0.1–0.3 mg/kg i.v. for aldosterone, whereas 1.0 mg/kg i.v. was needed for 18-hydroxy-DOC inhibition and even 3.0 mg/kg i.v. for corticosterone inhibition.

As far as the blockers of 17 $\alpha$ -hydroxylation are concerned, the Table shows that Su-10'603, Su-8000 and Su-9055 were found to be strong inhibitors of cortisol and cortisone formation in this order of decreasing activity. On the other hand, they have no appreciable effect on 11 $\beta$ - or 19-hydroxylation as judged by the respective steroidogeneses from endogenous precursors. However, there was a very strong additional inhibition of aldosterone formation, in particular by Su-9055, nicotinamide having a marked quantitative influence. The biosynthesis of 18-hydroxycorticosterone, as one of the possible aldosterone precursors, was much less inhibited, if at all. Similar results were obtained using pregnenolone or progesterone as exogenous precursor; using 4-C<sup>14</sup>-corticosterone the formation of aldosterone was inhibited by 40  $\mu$ g Su-9055 and even that of 19-hydroxycorticosterone by 200  $\mu$ g.

In conclusion, these substances have been found to possess characteristic spectra of blocking activities; in terms of decreasing activity, the following order of inhibitions is suggested:

- Su-4885: aldosterone, 19-hydroxylation, 11 $\beta$ -hydroxylation,
- Su-8000: 17 $\alpha$ -hydroxylation, aldosterone, 18-hydroxylation,
- Su-9055: aldosterone, 17 $\alpha$ -hydroxylation, 19-hydroxylation,
- Su-10'603: 17 $\alpha$ -hydroxylation, aldosterone, 18-hydroxylation<sup>16</sup>.

*Zusammenfassung.* Der Einfluss von Su-4885 (Metopiron®), Su-8000, Su-9055 und Su-10'603 auf die Corticosteroid-Biosynthese wurde *in vitro* und teils *in vivo* untersucht. Ausser den bekannten Hemmeffekten auf die 11 $\beta$ - und 17 $\alpha$ -Hydroxylierung wurden davon unabhängig auch solche auf die Bildung von Aldosteron, 18-Hydroxy- und 19-Hydroxycorticosteron beobachtet.

F. W. KAHNT and R. NEHER

*Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Switzerland), August 10, 1962.*

<sup>14</sup> J. K. GRANT, in discussion on the paper by J. J. CHART at the International Congress on Hormonal Steroids, Milan, May 14–19th (1962).

<sup>15</sup> K. GRIFFITHS (1960), quoted by J. K. GRANT in Brit. Med. Bull. 18, 104 (1962).

<sup>16</sup> *Acknowledgments.* Our thanks are due to Dr. R. GAUNT for the Su-substances, to Dr. P. A. DESAULLES and Dr. K. SCHMID for valuable collaboration, and to Dr. A. WETTSTEIN for his encouraging interest.

## Répression par l'oxygène de la biosynthèse de la thiosulfate-réductase de *Proteus vulgaris*

TARR<sup>1</sup> a observé en 1933 que les suspensions cellulaires de *Proteus vulgaris* produisent de l'hydrogène sulfuré en présence de thiosulfate. MITSUHASHI et MATSUO<sup>2,3</sup> ont montré que les extraits du même organisme catalysent la réduction de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>=</sup> en SO<sub>3</sub><sup>=</sup> et H<sub>2</sub>S. Travaillant avec les bactéries sulfato-réductrices, ISHIMOTO, KOYAMA et NAGAI<sup>4</sup> ont abouti à des conclusions identiques. Les recherches de ces derniers auteurs établissent que les extraits de *Desulfovibrio desulfuricans* acquièrent la faculté de consommer l'hydrogène en présence de thiosulfate lorsqu'on leur ajoute un indicateur chimique d'oxydoréduction. Nous verrons qu'une méthode basée sur l'emploi du benzyl-viologène permet de mesurer l'activité thiosulfate-réductase des extraits bruts de *P. vulgaris*. A l'aide de la technique ainsi mise au point, nous avons étudié l'influence de l'oxygène sur la biosynthèse de l'enzyme par les cultures sur milieu complexe.

Nous avons employé la souche 41 qui nous a été procurée par M. Roux. La souche est conservée par repiquage sur gélose nutritive. On utilise pour les cultures un milieu liquide complexe dont la composition est la suivante: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O, 3.575 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.98 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.03 g; NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g; FeSO<sub>4</sub> et CaCl<sub>2</sub>, traces; extrait de levure Difco, 0.25 g; bacto-peptone Difco,

0.25 g; eau, 1000 ml; pH 7. Le glucose (2 g/1000 ml) stérilisé à part est ajouté au moment de l'ensemencement. La solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (1 g/1000 ml) est stérilisée par filtration. Les cultures aérobies sont réalisées dans des fioles à toxine agitées. Les cultures anaérobies sont placées dans des ballons sous vide. On récolte les bactéries par centrifugation après 16 h d'incubation à 32°. On ajoute du chloramphénicol (25  $\mu$ g/ml) aux cultures aérobies pour éviter qu'elles ne synthétisent la thiosulfate-réductase pendant la centrifugation. A la concentration employée, cet antibiotique n'exerce aucune action inhibitrice à l'égard de l'enzyme. Les extraits sont préparés par traitement sonique (10 min) des suspensions bactériennes dans un appareil Raytheon. Ils sont séparés des débris cellulaires par centrifugation (15000 tours/min; 20 min). Leur teneur en azote protéique est évaluée par micro-Kjeldahl. La préparation d'hydrogénase est obtenue par traitement sonique d'une suspension de *Desulfovibrio desulfuricans*. Toutes les expériences sont réalisées à 37° en tampons phosphates pH 7. Les -Q<sub>H</sub> représentent les vitesses de consom-

<sup>1</sup> H. L. A. TARR, Biochem. J. 27, 1869 (1933).

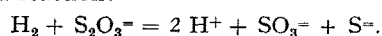
<sup>2</sup> S. MITSUHASHI et Y. MATSUO, J. exp. Med. 20, 729 (1950).

<sup>3</sup> S. MITSUHASHI et Y. MATSUO, J. exp. Med. 23, 1 (1953).

<sup>4</sup> M. ISHIMOTO, J. KOYAMA et Y. NAGAI, J. Biochem. 42, 41 (1955).

mation de  $H_2$ ; ils sont exprimés en  $mm^3$  de gaz (conditions normales) par heure et par mg d'azote. L'unité de thiosulfate-réductase est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la réduction d'une  $\mu mole$  de  $S_2O_3^{2-}$  en 1 h. On dose l'hydrogène sulfuré avec une solution d'iode, après entraînement par l'azote et fixation dans une solution d'acétate de zinc. Pour doser le sulfite, on utilise une méthode iodométrique par différence basée sur la formation d'un composé d'addition entre ce corps et l'aldéhyde formique.

Nous allons tout d'abord donner une description détaillée de la méthode utilisée pour mesurer l'activité des extraits. On utilise la technique manométrique de Warburg avec des coupes possédant une capacité de 10 ml. Chaque système contient: 0.05 ml d'hydrogénase, 100  $\mu g$  de benzyl-viologène, le tampon et l'extrait de *P. vulgaris*. Une solution contenant 20  $\mu moles$  de  $Na_2S_2O_3$  est placée dans le diverticule. Le volume de la phase liquide est complété à 3 ml avec de l'eau. Pour absorber l' $H_2S$  on met 0.1 ml d'une solution saturée de  $CdCl_2$  dans le puit central. Les manomètres remplis de  $H_2$  sont mis à incuber dans un bain à  $37^\circ$ . On renverse la solution de  $Na_2S_2O_3$  dans la coupe (temps 0) lorsque la coloration violacée caractéristique de l'indicateur réduit s'est développée. Les mesures sont effectuées à intervalles de temps réguliers. On détermine les  $-Q_{H_2}$  à partir des pentes des courbes représentant les volumes de  $H_2$  consommés en fonction du temps. Précisons que l'éventualité d'une réaction chimique spontanée entre le benzyl-viologène réduit et le thiosulfate se trouve exclue par le fait qu'aucune consommation notable de gaz ne se produit en l'absence d'extrait. D'autre part, l'inactivation des extraits par chauffage à  $100^\circ$  établit la nature enzymatique de la réaction étudiée. Dans les conditions précédemment définies, la réductase est saturée par son substrat puisque la courbe 1 (Figure 1) est rectiligne pendant toute la durée de l'expérience. La courbe 2 nous révèle que l'activité d'un système contenant 5  $\mu moles$  de  $S_2O_3^{2-}$  subit une décroissance brusque quand la consommation de gaz atteint 112  $mm^3$  (5  $\mu moles$ ) et se stabilise ensuite à une valeur nettement plus faible égale à celle obtenue en présence de  $SO_3^{2-}$  (Courbe 3, Figure 1). Il ressort des observations précédentes que la réduction du thiosulfate donne vraisemblablement lieu à une accumulation de sulfite. Cette manière de voir a reçu des preuves expérimentales directes. Nous avons en effet constaté que la réduction d'une  $\mu mole$  de  $S_2O_3^{2-}$  conduit à la formation de 1.49  $\mu mole$  d' $H_2S$  et de 0.66  $\mu mole$  de  $SO_3^{2-}$ ; une seconde expérience a donné 1.74  $\mu mole$  d' $H_2S$  et 0.52  $\mu mole$  de  $SO_3^{2-}$ . Le fait qu'on ne trouve jamais les deux produits de la réaction en quantités équimoléculaires est dû à ce qu'une fraction importante du sulfite a déjà été réduite en  $H_2S$  lorsque sont effectués les prélèvements. Nos systèmes présentent par conséquent une activité sulfite-réductase; celle-ci est due au moins en partie à la préparation brute d'hydrogénase. Les calculs montrent d'autre part que la réduction d'une  $\mu mole$  de  $S_2O_3^{2-}$  consomme 0.93  $\mu mole$  de  $H_2$ . Nos bilans confirment les résultats de ISHIMOTO et al.<sup>4</sup> obtenus avec une autre espèce bactérienne et établissent que les extraits de *P. vulgaris* catalysent la réaction:



La vitesse à laquelle l'hydrogène est consommé par des systèmes contenant 20  $\mu moles$  de  $S_2O_3^{2-}$  varie proportionnellement au volume d'extrait (Figure 2). Il en résulte que l'activité est limitée par la réductase. On calcule le nombre d'unités d'enzyme à partir du  $-Q_{H_2}$  en tenant compte du fait que la réduction d'une  $\mu mole$  de  $S_2O_3^{2-}$  exige 22.4  $mm^3$  de gaz. Il faut déduire de la valeur

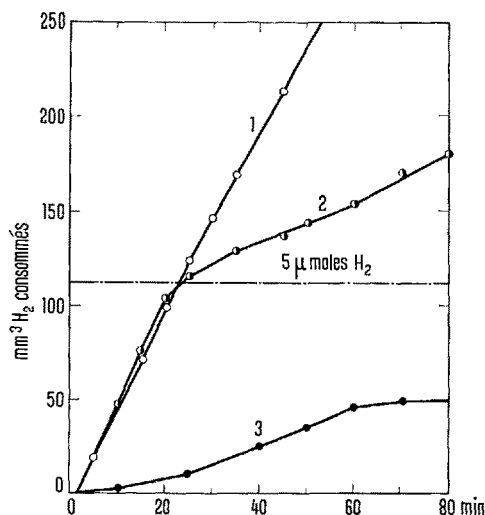


Fig. 1. Consommation de  $H_2$  en fonction du temps. Chaque système contient 0,06 ml d'un extrait de *P. vulgaris* (culture anaérobie sur milieu contenant du thiosulfate). Les solutions de  $Na_2S_2O_3$  et de  $Na_2SO_3$  placées dans le diverticule sont ajoutées au temps 0. Courbe (1), 20  $\mu moles$  de  $Na_2S_2O_3$ . Courbe (2), 5  $\mu moles$  de  $Na_2S_2O_3$ . Courbe (3), 20  $\mu moles$  de  $Na_2SO_3$ .

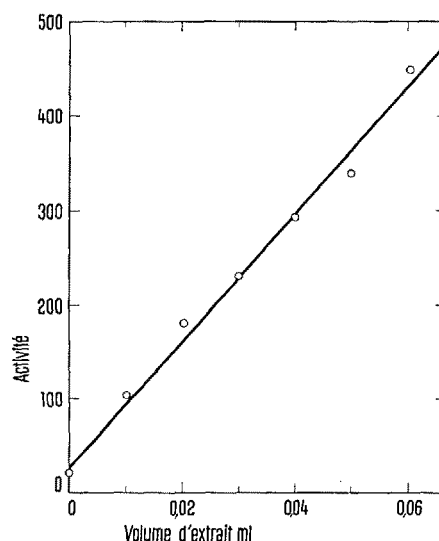
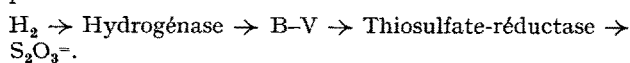


Fig. 2. Vitesse de consommation de  $H_2$  en fonction de la quantité d'extrait de *P. vulgaris* ( $mm^3/h/système$ ).

trouvée la faible activité thiosulfate-réductase de la préparation d'hydrogénase; celle-ci est fournie par l'ordonnée du point d'intersection de la courbe de la Figure 2 avec l'axe des ordonnées. Pour effectuer des mesures significatives, il faut choisir des volumes d'extrait correspondant à une activité inférieure à 40  $mm^3$  de gaz en 5 min. Dans nos systèmes, le benzyl-viologène établit un couplage chimique entre deux enzymes, l'hydrogénase et la thiosulfate-réductase. Le trajet suivi par les électrons est le suivant:



Examinons les résultats groupés sur le Tableau. On voit que l'addition de thiosulfate au milieu ne modifie pas sensiblement l'activité des cultures anaérobies. Nous

avons vérifié que l'emploi d'un milieu dépourvu de sulfate n'entraîne point une diminution de l'activité des cultures anaérobies, ce qui exclut la possibilité que la formation de l'enzyme soit induite par l'ion  $\text{SO}_4^{2-}$  analogue structural de l'ion  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Il est d'autre part peu vraisemblable qu'une substance organique soufrée présente dans les produits Difco soit douée d'une fonction inductrice. Nous sommes donc amenés à considérer que la thio-sulfate-réductase de *P. vulgaris* est probablement de nature constitutive. Le fait saillant qui ressort de nos résultats est l'inactivité complète des extraits de cultures aérobies. Un certain nombre d'expériences complémentaires ont été réalisées en vue d'expliquer cette dernière observation. En face d'une telle situation, on peut toujours envisager *a priori* l'éventualité d'une inactivation irréversible de l'enzyme au contact de l'oxygène. Toutefois dans le cas présent, celle-ci doit être écartée puisque l'aération pendant 5 h d'un extrait de culture anaérobie n'exerce aucune influence sur son activité. D'autre part, l'addition d'un extrait de culture aérobie ne modifie

point l'activité d'un extrait de culture anaérobie, ce qui conduit au rejet de l'hypothèse suivant laquelle les bactéries formeraient en aérobiose un inhibiteur de la réductase. En définitive une seule possibilité demeure: l'oxygène réprime la formation de l'enzyme dans les cultures aérobies. On ne se trouve point là en présence d'un cas isolé puisque la nitrate-réductase d'*Aerobacter aerogenes*<sup>5,6</sup>, la nitrite-réductase<sup>7</sup> et l'oxyde nitreux-réductase<sup>8</sup> de *Micrococcus denitrificans*, ne sont pas synthétisées en aérobiose. Une idée générale se dégage de notre présent travail et de nos recherches antérieures: les réductases bactériennes dont la fonction physiologique essentielle est de permettre l'utilisation de nombreux composés oxygénés du soufre et de l'azote comme accepteurs d'hydrogène, sont soumises à l'action répressive de l'oxygène atmosphérique.

**Summary.** The extracts obtained from aerobic cultures of *Proteus vulgaris* are completely without thiosulfate reductase activity. This phenomenon can be explained by the repression of biosynthesis of the enzyme by oxygen.

F. PICHINOTY

Influence des conditions de croissance sur l'activité thiosulfate-réductase des extraits

	Cultures anaérobies		Cultures aérobies	
	avec $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	sans $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	avec $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	sans $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
$-\text{QH}_2$	1950	1390	0	0
	3400	1250	0	0
N	87	62	0	0
	152	56	0	0

On donne dans chaque cas les résultats de deux expériences distinctes. N représente le nombre d'unités d'enzyme par mg d'azote protéique.

Laboratoire de Chimie Bactérienne, Centre National de la Recherche Scientifique, C.R.S.I.M., Marseille (France), le 23 mai 1962.

<sup>5</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Biochim. biophys. Acta 48, 218 (1961).

<sup>6</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Nature 191, 879 (1961).

<sup>7</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Biochim. biophys. Acta 52, 386 (1961).

<sup>8</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Ann. Inst. Pasteur 101, 418 (1961).

## The Mode of Action of Pilocarpine on the Resistance of the Chamber Angle of the Primate Eye<sup>1</sup>

The therapeutic effect of pilocarpine in chronic simple glaucoma is due to its ability to reduce the outflow resistance through the chamber angle in many cases of glaucoma. A similar effect is obtained also in the normal eye. It is a widely held belief (see LEYDHECKER<sup>2</sup> for references) that this action is due to the muscarinic effect of pilocarpine on the ciliary muscle. Contraction of the muscle is thought to affect the trabecular meshwork. The following experiments performed in the monkey, *Cercopithecus aethiops* (green vervet), indicate that this view has to be modified. They show that atropine quickly abolishes the pilocarpine-induced spasm of the ciliary muscle without reversing the effect on outflow resistance at the same time.

**Methods.** Adult monkeys were anaesthetized with intravenous pentobarbital. Refraction was determined by retinoscopy. Outflow resistance was studied by infusing 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  of 0.9% NaCl into the anterior chamber and recording the pressure by means of a strain-gauge transducer. Infusion was by motor-driven syringe. Injections into the anterior chamber were by a micrometric syringe connected to a side arm of the needle in the anterior chamber.

**Results.** Figure 1 demonstrates that 0.2 mg pilocarpine HCl placed on the cornea 1 h before the experiment reduces the outflow resistance: the pressure rise on in-

fusion on the treated side is somewhat less than half that on the control side. The experiment is typical, the average resistance on the treated side was 48% of that on the control side (range 24–70%, 6 animals).

Figure 2 shows the effect of injecting 1 mg/kg atropine sulphate i.v. over 30 sec on refraction in similarly pilocarpine-treated eyes and on intra-ocular pressure during continuous infusion of 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  of saline into pilocarpine-treated and control eyes. At this rate of infusion into the anterior chamber, pressure changes are mainly due to resistance changes.

The refraction data were obtained from 8 different monkeys, one contributing both eyes at 5 days interval. Experimental values for each eye were plotted and values for whole minutes derived by interpolation. The curve shows the average of these interpolated values. Refraction '0' has arbitrarily been assigned to the asymptote. The initial degree of myopia could only be measured with great difficulty due to the miosis and the values are uncertain. Readings were obtained in 4 cases, they were -4, -4, -6, and -8 diopters. As a rule the pupil widened within 1 min after the atropine and, as the curve shows, accommodation relaxed within 3–5 min.

<sup>1</sup> This investigation was supported by P.H.S. grant B-3060 from the U.S. National Institute of Neurological Diseases and Blindness.

<sup>2</sup> W. LEYDHECKER, *Glaukom, ein Handbuch* (Springer 1960).