

lysis occurred after the following periods in h:  $2\frac{3}{4}$ ,  $3\frac{1}{2}$ , 4,  $4\frac{1}{2}$ , 4, 5,  $3\frac{1}{2}$  and 4 (average:  $3\frac{55}{60}$ ).

In a third series, separate solutions of UK (2500 U/ml) and 5% Polysorbate were given simultaneously in separate veins. In 9 animals lysis occurred after the following hours:  $7\frac{1}{2}$ ,  $7\frac{1}{2}$ , 6,  $4\frac{1}{2}$ , 4, 5,  $7\frac{1}{2}$ , 7 and 8 (average:  $6\frac{19}{60}$ ). This approaches the period of time required for UK alone.

**Discussion.** Many organic compounds are known to enhance lysis of fibrin clots<sup>2</sup>. Quaternary detergents enhance the fibrinolytic activity of trypsin and in small concentrations also that of streptokinase-activated human plasmin (chiefly consisting of SK-activator)<sup>3</sup>. Some non-ionic wetting agents also enhanced fibrinolysis by SK-activator, presumably due to a stabilizing influence<sup>4</sup>. Loss in activity caused by adsorption to glass can often be prevented by gelatine<sup>5,6</sup> or by Tween 80<sup>7</sup>. Our results show that gelatine or Polysorbate 80 prevents or decreases the adsorption of UK to glass, but a potentiating effect appears also to exist, since the total yield of activity was increased. Triton X, another surface-active agent, releases plasminogen activator from lysosomes<sup>8</sup>. Intravenously applied, an inhibition of fibrinolysis was reported<sup>9</sup>. Sodium morrhuate, an anionic detergent, destroys fibrinolytically active cells of the vessel wall<sup>10</sup>. Our results indicate that Polysorbate enhances the effect of UK on thrombolysis in vivo. Whether this enhancement is due to a stabilization of the active compound or to a prevention of its removal by adsorption is as yet unknown. Interestingly, a compound enhancing thrombolysis in a simulated circulation system has been isolated from red blood cells<sup>11</sup>, suggesting a possible role in the normal resolution of thrombi<sup>12</sup>.

**Zusammenfassung.** Polysorbate 80 (Tween 80®), eine polyhydroxyle, nicht-ionisierbare, oberflächenaktive Sub-

stanz, vermindert die Adsorption von Urokinase an Glas, erhöht deren fibrinolytische Aktivität in vitro und steigert ihre thrombolytische Wirkung in experimentell hervorgerufenen Thrombosen im Kaninchen.

H. C. KWAAN, P. BRAKMAN  
and T. ASTRUP

*The James F. Mitchell Foundation, Institute for Medical Research, Washington (D.C. 20015, USA), 18th November 1966.*

<sup>2</sup> K. N. VON KAULLA, in *Chemistry of Thrombolysis: Human Fibrinolytic Enzymes* (Charles C. Thomas, Springfield, Illinois 1963), p. 261.

<sup>3</sup> T. ASTRUP and N. ALKJAERISIG, *Nature* 168, 565 (1951).

<sup>4</sup> M. N. RICHARD and B. E. SANDERS, *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 211 (1963).

<sup>5</sup> P. BRAKMAN, P. KLUG and T. ASTRUP, *Thromb. Diath. haemorrh.* 11, 234 (1964).

<sup>6</sup> M. LASSEN, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 10, 384 (1958).

<sup>7</sup> K. MAGNUS, J. GULD, H. WAALER and M. MAGNUSSEN, *Am. Rev. Tuberc. pulm. Dis.* 74, 297 (1956). — H. WAALER, J. GULD, K. MAGNUS and M. MAGNUSSEN, *Bull. Wld Hlth Org.* 19, 783 (1958).

<sup>8</sup> CH. H. LACK and S. Y. ALI, *Nature* 207, 1030 (1964).

<sup>9</sup> E. E. CLIFFTON and A. R. BURCHELL, *Thromb. Diath. haemorrh.* 5, 463 (1961).

<sup>10</sup> H. C. KWAAN and T. ASTRUP, *Circulation Res.* 17, 477 (1965).

<sup>11</sup> N. BACK, A. E. MUNSON, B. R. MUNSON, H. B. LASSMAN, C. M. AMBRUS and J. L. AMBRUS, *Fedn Proc. Fedn Am. Soc. exp. Biol.* 24, Abstract No. 1432, 387 (1965).

<sup>12</sup> This work was supported by Grants Nos. HE-05020 and HE-7804 from the National Institutes of Health, National Heart Institute. The address of Dr. KWAAN is now: Northwestern University, Department of Medicine, Chicago (Illinois, USA).

## Inhibition par les sels de tétrazolium de l'activité monoamine-oxydasique d'une suspension mitochondriale de cerveau de mouton

Les sels de tétrazolium sont d'un emploi fréquent en microscopie optique et électronique pour la détection de diverses deshydrogénases; c'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier l'action éventuelle de ces sels sur l'activité de l'une d'entre elles: la monoamine-oxydase d'origine cérébrale.

**Matériel et méthodes.** (1) Source enzymatique. Nous avons choisi comme préparation enzymatique une suspension de mitochondries de cerveau de mouton préparée d'après SOMOGYI et al.<sup>1</sup>. Les cerveaux d'agneaux de 6-7 mois recueillis à l'abattoir immédiatement après l'abatage dans une solution de saccharose 0,25 M maintenue à environ 4°C, sont ensuite broyés et homogénéisés au broyeur de Potter dans une solution de saccharose 0,25 M tamponnée à pH 7,4 (EDTA: 0,001 M — tampon Tris HCl 0,01 M). Le surnageant obtenu après une première centrifugation de 10 min à 1150 g est centrifugé 15 min à 12650 g. Le culot ainsi obtenu est repris par une solution de saccharose 0,25 M non tamponnée et centrifugé 10 min à 16500 g. Le dernier culot est finalement repris par une solution de saccharose 0,25 M non tamponnée de façon à

obtenir environ 0,5 ml de suspension pour 1 g de tissu cérébral frais.

Toutes les opérations sont conduites en chambre froide entre 0 et 4°C et les suspensions obtenues sont conservées congelées à -20°C.

Les préparations mitochondriales ont été contrôlées par une étude au microscope électronique. Les culots de la dernière centrifugation sont fixés à l'acide osmique à 2% en milieu tamponné selon PALADE<sup>2</sup> pendant 1 h puis, après deshydratation à l'alcool éthylique, inclus dans l'araldite selon la méthode de GLAUERT et GLAUERT<sup>3</sup>. Les coupes ultra fines pratiquées grâce à un ultra-microtome Porter Blum ont été examinées sans coloration préalable avec un Superscope JEM. Les images obtenues montrent des plages de mitochondries semblant gonflées, d'aspect ovoïde et dont le grand axe mesure 1-1,5 µ. La pureté des préparations est supérieure à 95%.

<sup>1</sup> J. SOMOGYI, A. FONYO et I. VINCZE, *Acta physiol. hung.* 21, 295 (1962).

<sup>2</sup> G. E. PALADE, *J. exp. Med.* 95, 285 (1952).

<sup>3</sup> A. M. GLAUERT et R. H. GLAUERT, *J. biophys. biochem. Cytol.* 4, 191 (1958).

Tableau I. Oxydation de la tyramine; consommation d'oxygène en  $\mu\text{l}/\text{mg}$  de protéines (valeurs moyennes  $\pm$  leur écart type)

(S)	t: 5	10	15	20	25	30	35	40
$3,45 \cdot 10^{-3} M$	$0,26 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,09$	$1,28 \pm 0,11$	$1,52 \pm 0,16$	$1,80 \pm 0,18$	$2,06 \pm 0,17$
$1,38 \cdot 10^{-3} M$	$0,22 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,08$	$0,69 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,11$	$1,07 \pm 0,11$	$1,24 \pm 0,16$	$1,45 \pm 0,18$	$1,60 \pm 0,19$
$0,69 \cdot 10^{-3} M$	$0,19 \pm 0,08$	$0,40 \pm 0,09$	$0,59 \pm 0,11$	$0,69 \pm 0,12$	$0,83 \pm 0,14$	$0,93 \pm 0,16$	$1,04 \pm 0,16$	$1,09 \pm 0,20$

t, temps d'incubation en min; (S), concentration en tyramine.

(2) Dosage de l'activité monoamine oxydasique. L'activité monoamine oxydasique est évaluée manométriquement par la consommation d'oxygène mesurée au respiromètre de Warburg en présence de tampon phosphate ( $0,24 M$ , pH 7) et à  $38^\circ C$  selon CREASEY<sup>4</sup>. Le substrat employé est le chlorhydrate de Tyramine. Les résultats obtenus sont rapportés à 1 mg de protéines, protéines dosées par la méthode du biuret<sup>5</sup>.

**Résultats expérimentaux.** Activité monoamine oxydasique de la suspension mitochondriale. Nous avons tout d'abord voulu vérifier que la préparation mitochondriale possédait une activité «mono-amine oxydase» vis à vis de la tyramine et que cette activité était suffisamment constante d'un lot à l'autre pour permettre des mesures reproductibles.

Le Tableau I groupe les valeurs moyennes obtenues pour 3 concentrations différentes de chlorhydrate de tyramine et les écarts-types correspondants.

Nous avons déterminé graphiquement la constante de Michaelis d'après la courbe  $1/V_i = f(1/S)$  (Figure 1) ( $V_i$  = vitesse initiale, S = concentration en substrat), établie selon LINEWEAVER et BURK<sup>6</sup>.

$$K_m = 6,1 \pm 0,7 \cdot 10^{-4} M$$

Nous avons d'autre part pratiqué une étude comparative de différents substrats. Cette dernière est résumée dans la Figure 1 qui représente les diverses courbes  $1/V_i = f(1/S)$  obtenues avec 6 des 7 substrats étudiés: 2 dérivés du tryptophane: serotonine et tryptamine, et 4 dérivés de la tyrosine: tyramine, dopamine, noradrénaline et adrénaline. Les 2 dérivés indoliques ont les constantes de Michaelis les plus faibles ce qui est conforme aux résultats habituellement obtenus<sup>7</sup>. La minime activité obtenue lorsque l'histamine est utilisée comme substrat est également en conformité avec ce qui est constaté par d'autres auteurs<sup>8</sup>. (La consommation d'oxygène optimale

mesurée dans ces conditions est très faible:  $0,29 \pm 0,04 \mu\text{l}/\text{mg}$  protéines en 40 min.)

Action des sels de tétrazolium sur l'activité monoamine-oxydasique. L'action des différents sels de tétrazolium sur l'activité amine-oxydasique de la préparation de mitochondries cérébrales de mouton a été étudiée en remplaçant dans les fioles de Warburg une certaine quantité d'eau par une quantité égale de solution aqueuse de ces sels, le chlorhydrate de tyramine étant toujours utilisé comme substrat.

Nous avons étudié 5 sels de tétrazolium dont 2 monotétrazolium: bromure de 3-(4,5-diméthyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyltétrazolium = MTT; chlorure de 2-(p-iodophenyl)-

Tableau II. Consommation d'oxygène en  $\mu\text{l}/\text{mg}$  de protéines en 40 min d'incubation. (S), concentration en tyramine; (I), concentration en sel de tétrazolium.

MTT					
(S)	(I) 0	$29,1 \cdot 10^{-5} M$	$58,2 \cdot 10^{-5} M$	$116,4 \cdot 10^{-5} M$	
$3,45 \cdot 10^{-3} M$	1,87	1,31	0,61	0,38	
$0,69 \cdot 10^{-3} M$	1,07	0,82	0,38	0,31	
INT					
(S)	(I) 0	$24,2 \cdot 10^{-5} M$	$48,4 \cdot 10^{-5} M$	$96,8 \cdot 10^{-5} M$	
$3,45 \cdot 10^{-3} M$	2,10	1,13	0,97	0,81	
$0,69 \cdot 10^{-3} M$	1,04	0,83	0,69	0,50	
NBT					
(S)	(I) 0	$14,8 \cdot 10^{-5} M$	$29,5 \cdot 10^{-5} M$	$59,0 \cdot 10^{-5} M$	
$3,45 \cdot 10^{-3} M$	2,24	2,00	1,80	1,74	
$0,69 \cdot 10^{-3} M$	1,25	1,01	0,99	0,98	
TNBT					
(S)	(I) 0	$19,0 \cdot 10^{-5} M$	$34,5 \cdot 10^{-5} M$	$51,4 \cdot 10^{-5} M$	
$3,45 \cdot 10^{-3} M$	1,93	1,74	1,60	1,57	
$0,69 \cdot 10^{-3} M$	0,95	1,02	0,86	0,81	
NT					
(S)	(I) 0	$18,1 \cdot 10^{-5} M$	$36,2 \cdot 10^{-5} M$	$72,4 \cdot 10^{-5} M$	
$3,45 \cdot 10^{-3} M$	2,03	1,91	1,47	1,26	
$0,69 \cdot 10^{-3} M$	0,91	0,93	0,84	0,72	

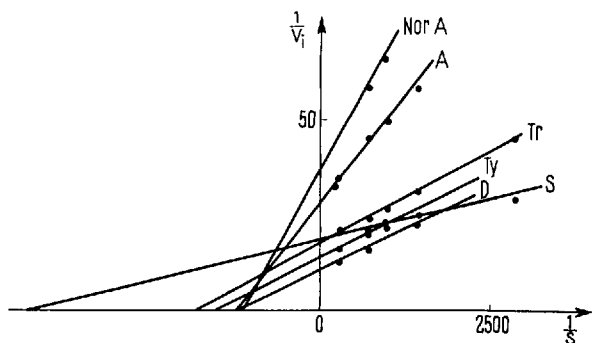


Fig. 1. Activité monoamine oxydasique de la suspension mitochondriale vis à vis de différents substrats. S, serotonine; D, dopamine; Ty, tyramine; Tr, tryptamine; A, adrénaline; Nor A, noradrénaline.  $V_i$ , vitesse initiale en  $\mu\text{l}$  d' $O_2$ /min/mg de protéine; S, concentration en substrat en  $M/l$ .

<sup>4</sup> N. H. CREASEY, Biochem. J. 64, 178 (1956).

<sup>5</sup> A. G. GORNALL, C. J. BARDWILL et N. H. DAVID, J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

<sup>6</sup> H. LINEWEAVER et D. BURK, J. Am. chem. Soc. 56, 658 (1934).

<sup>7</sup> A. N. DAVISON, Physiol. Rev. 38, 729 (1958).

<sup>8</sup> E. A. ZELLER, P. STERN et L. A. BLANDSMA, Naturwissenschaften 43, 157 (1956).

3-*p*-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium = INT; 3 ditetrazolium: chlorure de 2,2'-di-*p*-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphénylène)-ditetrazolium = NBT; chlorure de 2,2',5,5'-tetra-*p*-nitrophenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphénylène)-ditetrazolium = TNBT; chlorure de 2,2'-(*p*-diphénylène)-bis-(3,5-diphenyl)-tetrazolium = NT. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau II.

Comme l'avaient signalé LAGNADO et SOURKES pour NT<sup>9</sup> tous les sels de tetrazolium que nous avons étudiés inhibent l'activité mono-amine oxydasique. Cette inhibi-

tion est notée pour des concentrations de substrat et de tetrazolium comparables à celles utilisées lors de dosages de l'activité mono-amine oxydasique par mesure de l'intensité de la réduction des sels de tetrazolium<sup>10</sup>. On peut donc se demander s'il n'existe pas là un facteur risquant de perturber ces dosages.

Si l'on examine l'aspect des courbes  $1/V_i = f(1/S)$  obtenues avec différentes concentrations d'inhibiteur, l'inhibition se révèle être du type non compétitif (Figure 2)<sup>11</sup>.

**Summary.** 5 tetrazolium salts used in electronic microscopy are non-competitive inhibitors of monoaminooxidase activity of a sheep's brain mitochondrial suspension. This inhibition indicates that special caution must be taken in using these salts for detection of monoamine oxidase in optic or electronic microscopy.

C. LALLEMANT et C. BARON

Laboratoire de Biochimie médicale de l'Ecole de Médecine, et Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Dijon (France), le 27 octobre 1966.

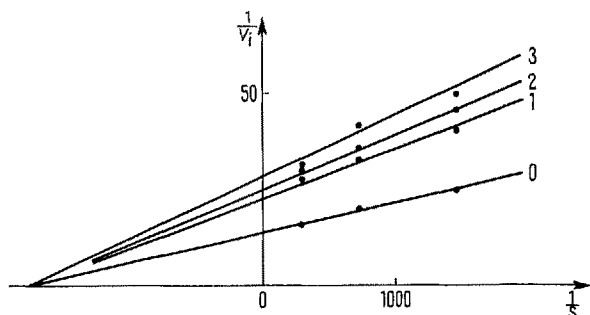


Fig. 2. Action du INT sur l'oxydation de la tyramine. 0, sans INT; 1, avec INT,  $24,2 \cdot 10^{-5} M$ ; 2, avec INT,  $48,4 \cdot 10^{-5} M$ ; 3, avec INT,  $96,8 \cdot 10^{-5} M$ .  $V_i$ , vitesse initiale en  $\mu l$  d' $O_2$ /min/mg de protéine;  $S$ , concentration en tyramine en  $M/l$ .

<sup>9</sup> J. R. LAGNADO et T. L. SOURKES, Can. J. Biochem. Physiol. 34, 1095 (1956).

<sup>10</sup> H. WEISSBACH, B. REDFIELD, G. GLENNER et C. MITOMA, J. Histochem. Cytochem. 5, 601 (1957).

<sup>11</sup> Nous remercions le Professeur Agrégé J. DEDREUX pour l'aide et les conseils qu'il nous a apportés au cours de ce travail.

### Variations de salinité chez la Tanche (*Tinca tinca* L.): Effet de la vagotomie sur l'intensité respiratoire et la teneur en eau et cations ( $Na^+$ et $K^+$ ) du tissu hépatique

Au cours de précédents travaux<sup>1,2</sup>, nous avons mis en évidence un déséquilibre osmotique chez la Tanche et l'Anguille pendant les variations de salinité. Ces animaux subissaient en effet une imbibition du tissu hépatique entraînant une augmentation du  $Q_{O_2}$ . Afin de tenter d'apporter une explication à ce phénomène, nous nous sommes intéressés à la régulation hydrominérale. On sait que celle-ci s'effectue, chez les euryhalins, par l'intermédiaire de plusieurs hormones. Interviennent l'interrénal antérieur, les corpuscules de Stannius (FONTAINE<sup>3</sup>), et aussi l'hypophyse (MOTAIS et MAETZ<sup>4</sup>), responsable en particulier du principe antidiurétique. Cette hormone est également active chez la Tanche puisqu'il est possible de prolonger la survie de cet animal en eau salée par des injections d'ADH (Vasopressine) (PEQUIGNOT<sup>5</sup>). Cependant, cette espèce sténohaline subit en eau salée une violente agression physiologique. Cet effet de choc à la suite d'une variation brusque de salinité a déjà été signalé par SERFATY et LABAT<sup>6</sup> sur le Muge, le Grisot et la Carpe; les auteurs invoquent une intervention vagale pour expliquer en partie ce phénomène.

Dans l'espoir d'atténuer l'effet de la salinité en supprimant cette action, nous avons réalisé la section des nerfs vagues et nous nous sommes proposé d'étudier l'effet de cette opération sur l'intensité respiratoire et la teneur en cations ( $Na^+$  et  $K^+$ ) des tissus de la Tanche.

**Matériel et méthodes.** Le nerf vague est sectionné en arrière du 5<sup>e</sup> arc branchial selon la technique décrite par LABAT et SERFATY<sup>7</sup>; le réseau vagal n'est pas détruit dans sa totalité; les nerfs branchiaux sont laissés intacts, tandis que les branches pharyngiennes, viscérales et latérales sont sectionnées. Les Tanches séjournent alors à basse température (10°C) pendant 10-15 jours, puis sont progressivement réadaptées à la température de l'eau courante (18-20°C) et enfin mises en expérience.

Comme dans notre précédent travail, l'adaptation à la salinité (ClNa 12‰/‰) s'effectue en 4 jours dans des bacs contenant 10 l d'eau filtrée. Les mesures sont réalisées à l'appareil de Warburg pour le  $Q_{O_2}$  ( $\mu l$   $O_2$ /mg poids sec/h) et au photomètre à flamme pour  $Na^+$  et  $K^+$  (mg/poids frais). Chaque chiffre représente la moyenne des résultats acquis sur 8 sujets.

**Résultats et discussion.** La vagotomie bilatérale ne produit pas chez la Tanche l'effet qu'on aurait pu attendre. Loin d'atténuer l'agression saline, la section des vagues semble au contraire la renforcer puisque le  $Q_{O_2}$  et les teneurs en  $Na^+$  sont bien plus élevés chez les Poissons

<sup>1</sup> J. PEQUIGNOT et A. SERFATY, Experientia 21, 227 (1965).

<sup>2</sup> J. PEQUIGNOT et A. SERFATY, Experientia 22, 121 (1966).

<sup>3</sup> M. FONTAINE, C. r. hebdo. Séanc. Acad. Sci., Paris 259, 875 (1964).

<sup>4</sup> R. MOTAIS et J. MAETZ, Gen. Comp. Endocrinol. 4, 210 (1964).

<sup>5</sup> J. PEQUIGNOT, Ann. de Limnologie (sous presse).

<sup>6</sup> A. SERFATY et R. LABAT, Comp. Biochem. Physiol. 3, 218 (1961).

<sup>7</sup> R. LABAT et A. SERFATY, Bull. Soc. Hist. nat. Toulouse 98, N° 1-2, 192 (1963).