

possible that membrane hydration is more directly involved in cellular metabolism than is commonly believed.

In view of the enhanced O_2 consumption of bone marrow cells incubated in the 3% 139,000 mol. wt. dextran in Tyrode's medium, it appears that size and concentration of the solute molecule is critical in cellular O_2 consumption. Because of the solvation properties of dextran this molecule would be expected to have marked influence on membrane hydration.

Zusammenfassung. Der Sauerstoffverbrauch von Knochenmarkszellen der Ratte in Thyrodelösung (verschiedene Konzentrationen und Molekulargewichte) wurde untersucht. Zwischen Sauerstoffverbrauch und Viskosität des suspendierenden Mediums oder des Volumens der Zellen

konnten keine Beziehungen gefunden werden. Mögliche physiologische Dextranwirkungen auf die Zellaktivität werden diskutiert.

R. M. GESINSKI, J. H. MORRISON,
J. R. TOEPFER¹⁰ and CH. V. RILEY

*Department of Biological Sciences,
Division of University Branches, Kent State University,
Kent (Ohio 44240, USA), 17 October 1969.*

¹⁰ Present address: Biology Department, Youngstown State University Youngstown (Ohio, USA).

La barrière capillaire enzymatique pour la DOPA au niveau de quelques noyaux du tronc cérébral du rat

Quelle qu'en soit la nature, il existe une barrière hématoencéphalique pour les monoamines¹. Pour leurs précurseurs, la Dopa en particulier, la décarboxylase (DC) de l'endothélium des capillaires cérébraux constitue une barrière enzymatique²⁻⁵. Elle est diminuée ou abolie par les inhibiteurs de la décarboxylase (I DC) ce qui facilite le passage de la Dopa dans le parenchyme cérébral^{3,4}. La barrière capillaire n'est pas égale dans toutes les régions du SNC. Elle peut être appréciée par la quantité d'IDC nécessaire pour l'abolir. Une cartographie des variations de l'action des IDC sur la barrière enzymatique pour la Dopa a été établie pour l'hypothalamus du rat⁶. Dans ce travail, nous étudions les variations de l'action des IDC sur cette barrière au niveau du tronc cérébral du rat.

Méthode. Dans une première expérimentation comprenant 11 animaux (rats albinos Wistar N.W. âgés de 8 à 10 semaines pesant de 200 à 250 g) prétraités par une dose fixe d'IMAO (Nialamid 250 mg/kg), nous avons administré des doses progressives (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 et 50 mg/kg) d'un IDC (Ro. IV 4602 = N1-(DL-Seryl)-N2-(2,3,4-trihydroxybenzyl-hydrazin) puis une dose fixe de L-Dopa 75 mg/kg. Animaux témoins (A) aucune drogue; (B) L-Dopa seule; (C) Nialamid + L-Dopa.

Dans une deuxième série de 10 animaux, nous avons répété la même expérience, mais sans prétraitement par le Nialamid. L'horaire de l'administration intrapéritonéale de ces différentes drogues était le suivant: 0 h Nialamid; 13.30 h Ro. IV-4602; 14.00 h L-Dopa; 15.00 h décapitation.

Les cerveaux de ces rats ont été lyophilisés et traités d'après la méthode histochimique pour l'observation des monoamines de FALCK⁷. Les blocs contenant les différentes parties du tronc cérébral ont été coupés en série avec montage d'une coupe sur 10. Les séries de préparations ainsi réalisées ont été comparées à la microscopie fluorescente.

Résultats. (a) Locus niger. A ce niveau déjà sans IDC on observe après administration de Dopa une légère augmentation de la fluorescence verte intraneuronale à côté de la fluorescence verte de l'endothélium capillaire. L'IDC administré à doses adéquates avant la Dopa abolit la fluorescence capillaire et augmente la fluorescence intraneuronale aussi bien dans la pars compacta que dans la pars reticulata (Figures 1 et 2). Avec 2 mg/kg d'IDC la

barrière n'est pas complètement abolie, on observe encore des capillaires fluorescents, mais il y a déjà une nette augmentation de la fluorescence intraneuronale par comparaison avec l'animal qui n'a pas reçu d'IDC. Avec 4 mg/kg d'IDC la barrière enzymatique est abolie et l'intensité de la fluorescence intraneuronale est déjà maximale. Des doses plus élevées d'IDC ne provoquent pas d'effet supplémentaire.

Les techniques classiques d'histologie avaient déjà permis d'observer au locus niger des contacts très étroits entre capillaires et corps neuronaux. Ce phénomène est bien visible aussi à la microscopie fluorescente après faible dose d'IDC et de L-Dopa; dans ces conditions en effet, les seules structures visibles sont les neurones à catécholamines et l'endothélium capillaire.

(b) Noyaux mésencéphaliques médians (A 10 de FALCK). Des constatations analogues concernant l'intensité de la barrière et les contacts neurones-capillaires ont été faites à ce niveau.

(c) Noyaux latéraux du pont et du bulbe. Pour ces structures à catécholamines intraneuronales l'IDC + Dopa provoque aussi une nette augmentation de la fluorescence péricaryonique, ceci déjà avant la disparition complète de la fluorescence endothéliale. Mais cette dernière ne disparaît qu'avec 10 mg/kg d'IDC.

(d) Locus coeruleus. Du fait de la densité des neurones fluorescents, il est difficile d'observer à ce niveau la fluorescence capillaire et d'apprécier son intensité. Aussi, est-il d'autant plus malaisé de déterminer la dose d'IDC par laquelle disparaît la fluorescence capillaire. D'autre

¹ H. WEIL-MALHERBE, J. AXELROD et R. TOMCHICK, *Science* 129, 1226 (1959).

² A. BERTLER, B. FALCK, C. OWMAN et C. ROSENGREN, *Pharmac. Rev.* 18, 369 (1966).

³ J. CONSTANTINIDIS, G. BARTHOLINI, R. TISSOT et A. PLETSCHER, *Helv. physiol. Acta* 25, 411 (1967).

⁴ J. CONSTANTINIDIS, G. BARTHOLINI, R. TISSOT et A. PLETSCHER, *Experientia* 24, 130 (1968).

⁵ C. OWMAN et E. ROSENGREN, *J. Neurochem.* 14, 547 (1967).

⁶ J. CONSTANTINIDIS, J. C. DE LA TORRE, R. TISSOT et F. GEISS-BÜHLER, *Psychopharmacologia* 15, 75 (1969).

⁷ B. FALCK et C. OWMAN, *Acta Univ. Lund* 2, 7 (1965).

part, l'IDC + Dopa ne provoquent pas de façon manifeste une augmentation de la fluorescence intraneuronale.

(e) Noyaux du raphé mésencéphalique et pontobulbaire. Les neurones de ces noyaux présentent normalement une fluorescence jaune caractéristique de la sérotonine. Après IDC et Dopa, on y observe une fluorescence

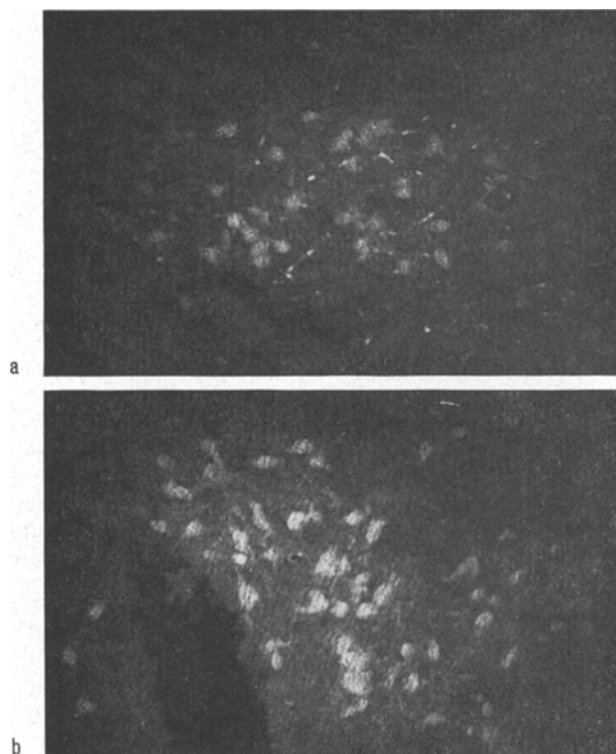


Fig. 1. Locus niger, pars compacta. (a) IMAO-Dopa: fluorescence capillaire et légère fluorescence neuronale. (b) IMAO-IDC 4 mg/kg-Dopa: pas de fluorescence capillaire, fluorescence neuronale plus intense.

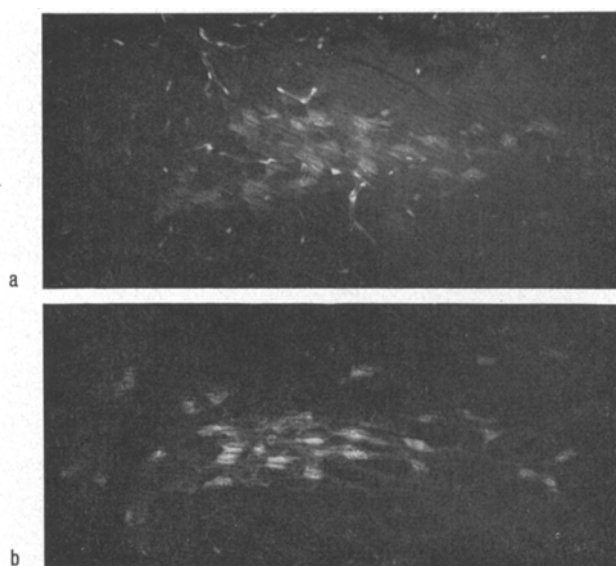


Fig. 2. Locus niger, pars reticulata. (a) IMAO-IDC 2 mg/kg-Dopa: fluorescence capillaire, fluorescence neuronale légèrement augmentée par rapport au témoin. (b) IMAO-IDC 4 mg/kg-Dopa: pas de fluorescence capillaire, fluorescence neuronale plus intense.

verte caractéristique des catécholamines. Ce phénomène apparaît déjà avant que la fluorescence capillaire soit abolie; cette dernière d'ailleurs persiste partiellement, au raphé ponto-bulbaire même avec de fortes doses d'IDC (50 mg/kg).

Nous avons, de plus, noté à ce niveau un phénomène curieux: il y existe des prolongements neuronaux au contact des capillaires qui s'enroulent même autour d'eux (Figure 3).

Dans les noyaux moteurs et sensitifs du tronc cérébral sans monoamines intraneuronales, ainsi que dans la substance blanche, la fluorescence capillaire disparaît avec 15 mg/kg d'IDC; on observe parallèlement une fluorescence diffuse qui est beaucoup plus intense dans la substance grise que dans la substance blanche.

Ajoutons encore que s'il faut 10 mg/kg d'IDC pour abolir la fluorescence capillaire au cortex cérébral, il en faut 15 pour le cortex cérébelleux. Au niveau des noyaux télencéphaliques à dopamine diffuse (striatum, tubercule olfactif) déjà sans IDC la Dopa provoque une légère augmentation de la fluorescence parenchymateuse à côté de la fluorescence capillaire. La fluorescence capillaire est abolie à ce niveau avec 8 mg/kg d'IDC. Ces diverses constatations sont résumées dans le Tableau.

Discussion. Au niveau de certains noyaux riches en catécholamines, striatum, locus niger, A 10 de FALCK, il suffit de doses relativement faibles d'IDC (4 à 8 mg) pour faire disparaître la fluorescence capillaire provoquée par la Dopa. C'est l'indice vraisemblable d'une barrière enzymatique capillaire pour la Dopa de faible intensité. Nos expériences ne permettent cependant pas d'exclure l'éventualité d'une accumulation différente d'IDC par les capillaires, accumulation importante dans les régions où de faibles doses d'IDC suffisent à abolir la barrière, minimales dans les régions où de fortes doses sont nécessaires. Quoi qu'il en soit, l'IDC facilite la pénétration de la Dopa dans diverses structures cérébrales. Ce phénomène, auquel s'ajoute la diminution du métabolisme périphérique de la Dopa^{8,9} peut rendre partiellement compte de l'efficacité à doses faibles de Dopa chez le parkinsonien qui reçoit parallèlement des IDC¹⁰.

Toutefois, dans d'autres noyaux riches en catécholamines, noyaux latéraux pontobulbaires par exemple, la barrière capillaire pour la Dopa est relativement élevée, du même ordre de grandeur que celle du cortex cérébral notamment. Malgré cela, même sans IDC, l'injection de Dopa entraîne une légère augmentation de la fluorescence parenchymateuse au niveau de ces noyaux alors qu'il n'en est rien au niveau du cortex cérébral. Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées pour rendre compte de ces constatations: (a) une intensité de la barrière même relativement élevée ne suffit pas à empêcher complètement le passage de la Dopa. Dans les noyaux du tronc, le peu de Dopa qui passe la barrière est transformée en catécholamines qui sont fixées et accumulées; au contraire, au niveau du cortex cérébral la Dopa qui a passé dans le parenchyme n'étant pas accumulée est éliminée; (b) il pourrait exister des lieux d'élection de passage de la

⁸ G. BARTHOLINI, H. M. BATES, W. P. BURKARD et A. PLETSCHER, *Nature, Lond.* 215, 852 (1967).

⁹ G. BARTHOLINI et A. PLETSCHER, *J. Pharmac. exp. Thé.* 161, 14 (1968).

¹⁰ R. TISSOT, J. M. GAILLARD, M. GUGGISBERG, G. GAUTHIER et J. de AJURIAGUERRA, *Presse méd.* 77, 619 (1969).



Fig. 3. Raphé bulbaire, IMAO-I DC 50 mg/kg-Dopa: persiste encore une légère fluorescence de l'endothélium capillaire; intense fluorescence verte des neurones contenant normalement de la sérotonine; prolongements neuronaux au contact des capillaires.

Dopa, «des fenêtres» dans la barrière enzymatique capillaire. Cette hypothèse est suggérée par l'existence au niveau du locus niger de contacts étroits entre capillaires et neurones et surtout par le comportement des neurones du raphé médian. A ce niveau, la barrière enzymatique capillaire pour la Dopa est très intense. La fluorescence capillaire ne disparaît pas complètement avec 50 mg d'IDC. Pourtant les neurones normalement chargés de sérotonine accumulent des catécholamines après injection de Dopa. Or, ils présentent de curieux prolongements qui viennent au contact des capillaires.

L'accumulation de catécholamines par des neurones normalement chargés de sérotonine remet en cause la spécificité des neurones à monoamines et pose le problème de l'ambiguïté de certains d'entre eux.

Appréciation de la barrière enzymatique pour la Dopa, par la dose d'IDC nécessaire pour abolir la fluorescence endothéliale

	Dose d'IDC nécessaire pour abolir la fluorescence endothéliale des capillaires du cerveau provoquée par la Dopa
Cortex cérébral	10 mg/kg
Cortex cérébelleux	15 mg/kg
Striatum	8 mg/kg
Locus niger et groupe A10 de FALCK	4 mg/kg
Noyaux latéraux pontobulbaires à catécholamines intraneurales	10 mg/kg
Noyaux tronculaires sans monoamines intraneurales et substance blanche	15 mg/kg
Noyaux raphé	50 mg/kg

Summary. An enzymatic barrier for Dopa exists at the level of the cerebral capillaries which changes Dopa into Dopamine by means of endothelial decarboxylase. It is abolished by a decarboxylase inhibitor. Its intensity is weaker in structures containing Dopamine (Striatum, Locus Niger). Neurones of the Raphé containing serotonin can be charged with catecholamines. There are close contacts between neurones and capillaries.

J. CONSTANTINIDIS, G. BARTHOLINI,
F. GEISSBÜHLER et R. TISSOT

*Clinique universitaire de Psychiatrie,
1225 Genève, et Département de recherches scientifiques,
F. Hoffman-La Roche Cie., S.A.,
Basel (Suisse), 18 novembre 1969.*

Action of Biogenic Amines on Crustacean Chromatophores: I. Differential Effect of Certain Indolealkylamines on the Melanophores of the Crabs *Uca pugilator* and *Carcinus maenas*

Although it is generally accepted that color changes in crustaceans are regulated by blood-borne substances^{1,2}, some recent studies³⁻⁶ indicate that in addition to the well-established peptide neurosecretory products some indolealkylamines may also be involved. However, because the latter agents were tested in vivo only, the question arises whether they act directly on the chromatophores or indirectly by stimulating the release of neurohormones (peptides) from the neurohemal organs. A solution to this problem would be to simultaneously assay these amines by in vitro as well as in vivo methods on the chromatophores.

Shore crabs, *Carcinus maenas*, supplied by the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, and fiddler crabs, *Uca pugilator*, supplied by the Gulf Specimen Company, Panama, Florida, were used in this investigation. The crabs were destaked at least 18 h prior to use in the experiments. All experiments were conducted on eyestalkless crabs at a temperature of 22–24 °C and under a light intensity of 377 meter-candles. Under these conditions the melanophoric pigment in the eyestalkless *Carcinus* and *Uca* was maximally concentrated. Each of the

following substances, serotonin creatinine sulfate, bufotenin bioxalate, tryptamine, 5-hydroxytryptophan, and creatinine sulfate, was tested in dosages ranging between 0.01 and 100 µg per crab. They were dissolved in crustacean saline⁷ and injected in doses of 0.05 ml per crab into *Uca* and 0.1 ml per crab into *Carcinus*. The controls received corresponding doses of crustacean saline alone. For comparison melanin-dispersing hormone in extracts of the eyestalks from *Carcinus* was injected into eyestalkless *Carcinus*. Eyestalks were freshly dissected, extracted in saline, boiled briefly, centrifuged, and the supernate

¹ M. FINGERMAN, *Physiol. Rev.* 45, 296 (1965).

² L. H. KLEINHOLZ, *Am. Zoologist* 6, 161 (1966).

³ T. AOTO, *J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool.* 15, 177 (1963).

⁴ M. GERSCH, H. UNGER, F. FISCHER and W. KAPITZA, *Zool. Jb., Physiol.* 70, 455 (1964).

⁵ A. C. J. BURGERS, *Pubbl. Staz. zool. Napoli* 34, 500 (1965).

⁶ A. G. BAUCHAU and J. C. MENGEOT, *Experientia* 22, 238 (1966).

⁷ C. F. A. PANTIN, *J. exp. Biol.* 11, 11 (1934).