

specifically inhibits the synthesis of DPA and the development of heat resistance. However, exogenous DPA cannot reverse the nicotinamide induced heat sensitivity. Further, spores produced in the presence of nicotinamide contained as much as 40% of the normal DPA as determined by the method of JANSSEN et al.<sup>11</sup>. It has been shown that if the DPA content of the spore is above 1.2%, viability is independent of the DPA content, and that, as the level of DPA is reduced below 1.2%, the proportion of non-viable spore-like bodies increased.

In the literature there has been no reference so far to the role of DPA as an electron acceptor in the heat resistance of bacterial endospores. The results obtained in our laboratory with picolinamide and nicotinamide suggest that in the heat resistance of bacterial endospores, the role of DPA as an electron acceptor may be important<sup>12, 14</sup>.

**Zusammenfassung.** Nicotinamide hemmt die Synthese von Dipicolinsäure (DPA) und die Entwicklung der Hitzeresistenz von *Bacillus cereus* T Sporen. Nicotinsäure hat keinen Effekt. Zugabe von DPA kann die Hitzsensitivität, die durch Nicotinamide induziert wurde, nicht rückgängig machen.

11 F. W. JANSSEN, A. J. LUND and L. E. ANDERSON, *Science* 127, 26 (1958).

12 This research has been financed in part by a grant made by the United States Department of Agriculture under No. P.L.480. Sincere thanks are also due to Dr. K. V. B. R. TILAK, for the help rendered during the preparation of the manuscript.

13 Request for reprints are to be addressed to the Librarian, U.P. Agricultural University, Pantnagar (Naini Tal, U.P., India).  
14 Journal Series Publication No. 244 Experiment Station, U.P. Agricultural University, Pantnagar, India.

15 Present address: Deptt. of Microbiology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

16 Request for reprints are to be addressed to the Librarian, U.P. Agricultural University, Pantnagar (Naini Tal, U.P., India).

17 Journal Series Publication No. 244 Experiment Station, U.P. Agricultural University, Pantnagar, India.

18 Present address: Deptt. of Microbiology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

19 Present address: Deptt. of Microbiology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

20 Present address: Deptt. of Microbiology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

## PRO EXPERIMENTIS

### Techniques simultanées de mesures: CO<sub>2</sub>(C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>) élimination urinaire et activité motrice chez la souris dans l'expérimentation métabolique des amphétamines

La dégradation métabolique des médicaments marqués au C<sup>14</sup> aboutit, dans de très nombreux cas, à la formation de C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>, éliminé par voie expiratoire. La vitesse et le taux de cette dégradation dépendent de la structure moléculaire du produit et de la position du marquage. Quoique cette voie d'élimination a un caractère secondaire, sa mesure quantitative est nécessaire à l'établissement de tout bilan.

La mesure du CO<sub>2</sub> expiratoire permet d'établir l'activité spécifique du C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>, ainsi que l'influence du médicament et de la dose administrée sur le métabolisme basal. Des dispositifs permettant d'effectuer ces mesures ont déjà été décrits dans la littérature<sup>1-4</sup>. Ils utilisent notamment pour la mesure de la radioactivité des compteurs G.M. ou des chambres d'ionisation. Ces dernières, d'une grande sensibilité instantanée, présentent un certain nombre d'inconvénients, notamment la nécessité d'un calibrage et une importante dérive.

Dans nos études, le caractère quantitatif de la mesure de la radioactivité du C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> prime celle de la sensibilité instantanée. Cette mesure s'effectue par scintillation liquide après absorption du CO<sub>2</sub> par l'éthanolamine<sup>5</sup>; elle est quantitative et d'une grande sensibilité. Le CO<sub>2</sub> expiratoire est mesuré par infrarouge.

La cage métabolique permet de collecter séparément l'élimination urinaire et fécale; elle est munie, entre autre, d'un dispositif de mesure de l'activité motrice de l'animal d'expérience. L'ensemble de l'appareil comporte les éléments suivants (Figure): Une cage métabolique de Roth, permettant l'alimentation de l'animal en nourriture et en eau. Les urines et les fèces peuvent être collectées séparément. La cage est alimentée en air par une pompe à membrane, assurant un débit de 0,5 l/min dans le cas de la souris, et de 1 l/min pour le rat. Le débit est mesuré par un débitmètre électronique (Hastings Mass Flowmeter), et cette information est enregistrée. La régulation

du débit s'effectue par un dispositif électronique utilisant l'information du débitmètre pour asservir la pompe à membrane. La température de l'air circulant peut être réglée à partir de la température ambiante jusqu'à 45°C par un dispositif électrique asservi au thermomètre de mesure. Deux rotomètres BROOKS SHO-150 en amont et en aval de la cage métabolique permettent d'évaluer une éventuelle chute de débit. La surpression à l'intérieur de la cage métabolique est d'environ 5 mm Hg. Après son passage dans la cage métabolique, l'air est desséché sur Cl<sub>2</sub>Ca contenu dans un cylindre de 5×40 cm Ø, incliné à 45°C. La mesure du CO<sub>2</sub> s'effectue par un appareil URAS-Medical (Hartmann et Braun AG, Frankfurt/Main, Allemagne). Détermination par infrarouge, mesure de 0,1 à 1% en volume de CO<sub>2</sub> et enregistrement. La calibration s'effectue par un mélange gazeux 0,5% CO<sub>2</sub>, 99,5N. La mesure de la radioactivité du C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> s'effectue par scintillation liquide après absorption quantitative du CO<sub>2</sub> par une solution d'éthanolamine/méthanol<sup>6</sup>. La mesure de l'oxygène absolu de 21 à 60% en volume et différentiel (21 à 18% en volume) s'effectue par un appareil «Doppeloxytest» (Hartmann et Braun AG, Frankfurt/Main, Allemagne). La mesure de la radioactivité du C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> s'effectue par scintillation liquide après

1 B. M. TOLBERT, M. KIRK et F. UPHAM, *Rev. scient. Instrum.* 30, 116 (1959).

2 G. V. LEROY, G. T. OKITA, E. C. TOCUS et D. CHARLESTON, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 7, 273 (1960).

3 F. CHEVALLIER, M. BRIÈRE, F. SERREL et M. CORNU, *J. Physiol.*, Paris 54, 701 (1962).

4 J. M. KINNEY, A. P. MORGAN, F. S. DOMINIQUE et K. J. GILDNER, *Metabolisme* 13, 205 (1964).

5 M. BAGGIOLINI, *Experientia* 12, 731 (1965).

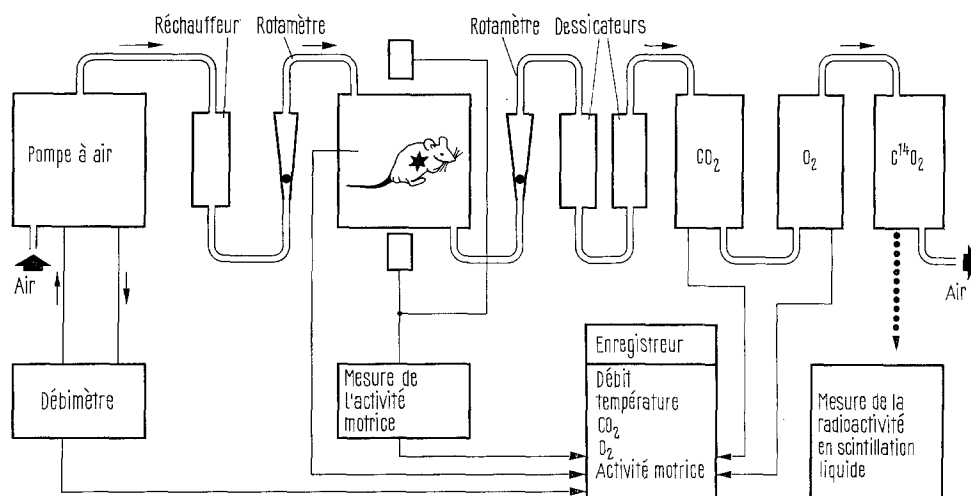


Schéma du dispositif de mesure simultanée du CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> et C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>, ainsi que de l'activité motrice pour l'étude métabolique des médicaments marqués.

absorption quantitative du CO<sub>2</sub> par une solution d'éthanolamine/méthanol<sup>6</sup>. A la sortie de l'appareil IR – et pour une période déterminée – en général 1 h – l'air, après saturation en méthanol dans 2 saturateurs en série contenant chacun 25 ml de méthanol, passe dans deux flacons absorbeurs contenant chacun 10 ml d'une solution éthanolamine/méthanol (V/V 20/80). Pratiquement la totalité du CO<sub>2</sub> est absorbée par le premier flacon absorbeur; on retrouve environ 0,2 à 2% de la radioactivité du premier dans le second. Cette valeur dépend de la quantité de CO<sub>2</sub> éliminée par l'animal. Après un temps de passage dans l'ensemble barboteur-absorbeur, le circuit d'air est permuté sur un autre jeu barboteur-absorbeur par un robinet à trois voies actionnant en même temps, par un jeu de cames, une horloge à impulsion. On prélève 1 ml de chacun des flacons absorbeurs; 10 ml de solution scintillante: toluène + PPO (4 g/l) sont ajoutés. La mesure de la radioactivité s'effectue par un spectromètre de scintillation liquide Beckman LS-200B. La correction du «quenching» est effectuée par la technique du standard externe.

Sur la cage métabolique, un dispositif photoélectrique permet de mesurer l'activité motrice de la souris selon la technique de TEDESCHI. Le nombre d'interruptions correspondant aux mouvements de l'animal est compté et enregistré à intervalles réguliers par un ensemble SLD5, ELB5 et ERHI.1 (Landis et Gyr).

**Fonctionnement et résultats.** Le dispositif ainsi mis au point peut être utilisé pour l'étude métabolique de toute substance marquée au C<sup>14</sup>. Il permet d'établir la cinétique

de formation du C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>, ainsi que l'influence du produit administré sur le métabolisme basal de la souris et du rat. Il permet la mesure du CO<sub>2</sub> dans des limites de 0,1 à 1% en volume. La quantité minimum détectable du C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> en radioactivité est de l'ordre de 10<sup>-4</sup> µCi/h, ce qui correspond, pour une injection de 50 µCi de produit marqué, à environ 1 ppm du produit administré.

Par ce dispositif, nous avons étudié plusieurs médicaments, et notamment le métabolisme de l'acide nifluminique C<sup>14</sup> chez le rat<sup>7</sup>. Pour ce produit, la cinétique d'élimination a été établie heure par heure et jusqu'au 17<sup>e</sup> jour après l'administration. Pour une période de 12 h, 5% de la dose est éliminée sous forme de CO<sub>2</sub>. La quantité retrouvée pendant une heure à la fin de l'expérience correspond à 30 ppm de l'activité injectée (Figure 2).

Pour nos études sur le métabolisme de la D- et L-amphétamine-C<sup>14</sup><sup>8</sup>, le C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> a été mesuré simultanément avec le métabolisme urinaire et l'activité motrice, notamment dans le cas du pré-traitement et de l'association d'autres médicaments avec l'amphétamine<sup>9</sup>.

**Summary.** An apparatus which permits simultaneous measuring of the expiratory CO<sub>2</sub>, the amount of C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in metabolic studies of labelled drugs, is described. The urine and faeces are collected in the metabolic cage of this apparatus. Furthermore, the motor activity of the animal can be measured and recorded.

A. BENAKIS

Laboratoire du Métabolisme des Médicaments  
de l'Université, Ecole de Médecine,  
CH-1211 Genève 4 (Suisse), 2 décembre 1969.

#### Spécifications des conditions expérimentales

CO <sub>2</sub>	0,1–1,0% vol.
C <sup>14</sup> O <sub>2</sub> , min. détectable	1 × 10 <sup>-4</sup> µCi/h
O <sub>2</sub> absolu	21–60%
O <sub>2</sub> différentiel	21–18%
Débit: Souris	0,5 l/h
Rat	1,0 l/h
Température/h	Ambiante 45°C Régulation ± 0,5°C
Surpression	2–5 mm Hg
Dessiccation	Cl <sub>2</sub> Ca

<sup>6</sup> A. BENAKIS, Cours de Perfectionnement sur les Applications de la Scintillation Liquide dans la Recherche Biologique et Médicale, Genève (1968), à paraître.

<sup>7</sup> A. BENAKIS, B. GLASSON et M. STROLIN-BENEDETTI, 2ème Congrès IUPAC de Chimie Pharmaceutique, Münster 1968. Biochem. Pharmac. 18, 633 (1969).

<sup>8</sup> A. BENAKIS et M. THOMASSET, Int. Symposium on Amphetamines (Istituto Mario Negri, Milan 1969).

<sup>9</sup> Remerciements. Nous remercions Messieurs J. RICHEZ, M. DUCLOS et R. HÄRING, qui, par leur aide technique, nous ont permis de réaliser cette installation. Nous remercions également le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour avoir financé une partie de cet équipement.