

Fig. 4. Cobaye mâle de 600 g.

1. Effet d'une dose de 20 mg/kg d'acétylsalicylate de lysine (ASL) sur le bronchospasme provoqué par 10 µg/kg d'acétylcholine (A). Injections i.v.
2. Enregistrement de la pression artérielle.

de l'Ach., non seulement au niveau des bronches mais aussi sur la pression artérielle (Figure 4).

4. *Action au niveau du cœur et des vaisseaux.* Chez le chien anesthésié au pentobarbital, nous avons observé l'action de l'ASL au niveau des vaisseaux fémoraux en injectant la substance soit dans une veine de la patte antérieure, soit directement dans la collatérale de l'artère fémorale. Le débit sanguin était enregistré à l'aide d'un débitmètre électromagnétique de type Nycotron à la fois au niveau de l'artère et de la veine fémorale. Nous n'avons pas observé de variation durable du débit, bien que les doses atteintes soient de 50 mg/kg par voie i.v. et de 10 mg par voie intraartérielle.

Chez le chien anesthésié au chloralose, après thoracotomie, nous avons placé un capteur de débit (Type Nycotron) autour de l'artère coronaire commune. En utilisant des doses de 50 mg/kg i.v., nous avons observé une augmentation transitoire du débit coronaire mais pas de modification de la pression artérielle ni de la fréquence cardiaque.

Discussion. Nos résultats incitent à conférer à l'acide acétylsalicylique une activité comimétique tout au moins au niveau de la pupille, de l'intestin et des bronches. Afin de rechercher si cette propriété n'était pas de type anticholinestérasique, nous avons eu recours à des tests cinétiques. Ces expériences, menées *in vivo*, n'ont pas montré de variations du taux des cholinestérases. Récemment, SCHNEIDER a proposé la variation du diamètre de la pupille de la souris comme test d'activité anticholinestérasique *in vivo*. Cette technique nous a donné d'excellents

résultats et plaide pour l'activité anticholinestérasique de l'acide acétylsalicylique. De plus, les techniques histochimiques semblent prouver que l'acide acétylsalicylique agit au niveau des pseudo-cholinestérases situées dans les parois des vaisseaux cérébraux du rat⁶.

Résumé et conclusion. Nos recherches expérimentales, favorisées par l'utilisation de l'acétylsalicylate de lysine (ASL), aspirine soluble et injectable, aboutissent à la conclusion que l'acide acétylsalicylique a une action parasympathicomimétique au niveau de la pupille de la souris, de l'intestin du chien et de la bronche du cobaye.

Summary. Our experiments, made possible by the utilisation of the injectable acetyl-salicylate lysine salt solution, lead us to conclude that acetyl-salicylique acid has a parasympathicomimetic action on the pupil of the mice, on the intestine of the dog and on the bronchi of the guinea-pig.

B. DELBARRE et E. ARON
avec la collaboration technique de
G. DUMAS et A. CHATELUS

*Clinique Médical de la Faculté de Médecine,
2bis Boulevard Tonnellé, F-37 Tours (France),
11 février 1971.*

⁶ B. DELBARRE, G. DELBARRE et P. JOBARD, (Experientia 27, 129 (1971)).

Etude histochimique de l'action de l'acide acétylsalicylique sur les pseudo-cholinestérases du cerveau du rat

L'introduction en thérapeutique d'une forme d'aspirine soluble, l'acétylsalicylate de lysine¹, nous a permis d'étudier son activité sur les cholinestérases au niveau du cerveau du rat. En effet, lors d'une étude pharmacologique de l'aspirine, nous avons mis en évidence certaines actions parasympathicomimétiques qui autorisaient à évoquer une activité anticholinestérasique².

Matériel et méthode. Nous avons utilisé des rats mâles de souche Charles River, d'un poids variant entre 200 et 400 g. Nos expériences ont porté sur 20 rats. L'animal est anesthésié avec du pentobarbital à la dose de 40 mg/g par voie intrapéritonéale. Par la carotide, nous perfusons une solution isotonique de Na₂SO₄ (16,7 g/l) suivie d'une solution isotonique de Na₂SO₄ contenant du formol à 10% (36% p/v).

Le cerveau est alors rapidement prélevé et placé dans une solution isotonique de Na₂SO₄-Formol 10% (36% p/v) pendant 4 h à la température de 4°C. Le cerveau est ensuite lavé à l'eau distillée puis déposé dans une solution d'éthanol à 20% pendant au moins 24 h.

La méthode de mise en évidence des cholinestérases est celle de KOELLE-FRIEDENWALD³. L'incubation est de 2 h à 37°C à pH 5,5. Les substances que nous avons utilisées sont les suivantes: la butyrylthiocholine (Koch-Light Laboratories Ltd) qui révèle spécifiquement l'activité des pseudocholinestérases⁴. L'acetylthiocholine (Koch-Light Laboratories Ltd) qui met en évidence les cholinestérases vraies et les pseudo-cholinestérases. L'iso-OMPA = Tetra-isopropylpyrophosphoramidé (Koch-Light Laboratories Ltd), inhibiteur spécifique de l'activité des pseudo-cho-

linestérases⁵. Le BW 284 C 51 (Welcome Research Laboratories Ltd), inhibiteur spécifique de l'activité des cholinestérases vraies⁶. L'acétylsalicylate de lysine (Aspegic).

Pour les inhibiteurs, une période de préincubation d'une demi-heure est réalisée, le pH étant ajusté à 5,5. Nous avons testé les substances suivantes: 1. l'acétylthiocholine; 2. la butyrylthiocholine; 3. l'acétylthiocholine + iso OMPA; 4. la butyrylthiocholine + iso OMPA; 5. l'acétylthiocholine + BW 284 C 51; 6. l'acétylthiocholine + acétylsalicylate de lysine; 7. la butyrylthiocholine + acétylsalicylate de lysine.

Résultats. Dans le cerveau, les cholinestérases vraies, révélées par l'acétylthiocholine sont localisées plus particulièrement au niveau des noyaux gris centraux.

Les pseudo-cholinestérases, révélées par la butyrylthiocholine, paraissent localisées presque exclusivement au niveau des parois des vaisseaux. Avec les inhibiteurs, les expériences montrent que l'iso-OMPA, à une concentration de ($10^{-4} M$) paraît inhiber complètement l'action des pseudo-cholinestérases. La réaction à la butyrylthiocholine est entièrement négative. Par contre, pour l'acétylsalicylate de lysine, il faut atteindre une concentration



Fig. 3. Inhibition de la mise en évidence de l'activité des pseudo-cholinestérases au niveau des vaisseaux des noyaux gris centraux du cerveau de rat. (Butyrylthiocholine + acétylsalicylate de lysine 2 mg 1 ml).

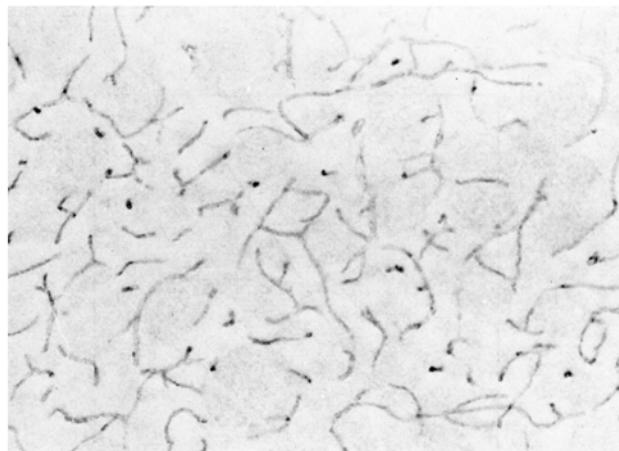


Fig. 1. Mise en évidence de l'activité des pseudocholinésterases au niveau des vaisseaux des noyaux gris centraux du cerveau de rat (Butyrylthiocholine).



Fig. 2. Inhibition de la mise en évidence de l'activité des pseudocholinestérases au niveau des vaisseaux des noyaux gris centraux du cerveau de rat. (Butyrylthiocholine + ISO-OMPA(10^{-4})).

de ($10^{-3} M$) pour obtenir une nette diminution de l'activité des pseudo-cholinestérases. A dose double, on constate une disparition presque totale de l'activité des pseudo-cholinestérases. Nous avons toutefois remarqué que la disparition de cette activité était plus nettement marquée au niveau de la substance grise qu'au niveau de la substance blanche.

Avec le BW 284, à la concentration de ($10^{-4} M$), nous avons constaté une disparition complète de l'activité des cholinestérases vraies.

Discussion. Nos résultats montrent que les cholinestérases vraies sont localisées au niveau des noyaux gris centraux. Quant aux pseudo-cholinestérases, elles sont localisées au niveau des parois des vaisseaux cérébraux du rat. Ces constatations sont en accord avec celles de KOELLE⁷ et de divers auteurs^{8,9}.

L'acide acétylsalicylique inhiberait donc les pseudo-cholinestérases. Ces faits sont à rapprocher des expériences réalisées chez diverses espèces animales qui établissaient que l'aspirine possédait des actions anticholinestérasiques au niveau de certains organes (intestin, bronche, œil)². Il semblerait donc que l'activité pharmacologique de l'aspirine pourrait s'expliquer par son activité au niveau des pseudo-cholinestérases. Malheureusement les hypothèses divergent sur le rôle physiologique de cet enzyme. De plus sa distribution diffère d'une espèce animale à l'autre¹⁰. Cependant la constatation d'une importante activité pseudo-cholinestérasique au niveau des parois des vaisseaux,

¹ L'acétylsalicylate a été mis à notre disposition par le Laboratoire EGIC.

² B. DELBARRE et E. ARON, *Experientia* 27, à paraître (1971).

³ G. B. KOELLE et J. S. FRIEDENWALD, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 70, 617 (1949).

⁴ M. G. ORD et R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.* 51, 245 (1952).

⁵ B. J. BAYLISS et A. TODRICK, *Biochem. J.* 62, 62 (1956).

⁶ B. HOLMSTEDT, *Acta physiol. scand.* 40, 322 (1957).

⁷ G. B. KOELLE, *J. Pharm. exp. Ther.* 106, 401 (1952); *J. comp. Neural.* 100, 211 (1954).

⁸ W. J. PEPLER et A. G. E. PEARSE, *J. Neurochem.* 7, 193 (1957).

⁹ F. JOE et B. CSILLIK, *Expl Brain Res.* 7, 147 (1966).

¹⁰ A. SILVER, *Int. Rev. Neurobiol.* 10, 57 (1967).

inhibée par l'acétylsalicylate de lysine pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle l'aspirine agirait sur l'aggrégation des plaquettes par son activité «anticholinestérasique».

Conclusion. En utilisant une forme soluble d'aspirine, l'acétylsalicylate de lysine, nous avons pu mettre en évidence chez le rat son action inhibitrice sur les pseudocholinestérases des parois des vaisseaux du cerveau. Ces résultats pourraient rendre compte de l'activité de l'aspirine dans l'aggrégation plaquettaire.

Summary. Using an injectable solution of acetyl salicylate lysine salt it was shown that aspirine has an action on the pseudocholinesterases in the brain vessels of the

rat. This could help to explain the activity of aspirine in case of platelets aggregation.

B. DELBARRE, G. DELBARRE
et P. JOBARD¹¹

Laboratoire d'Anatomie pathologique et Clinique Médicale de la Faculté de Médecine, 2bis, Boulevard Tonnelé, F-37 Tours (France), 11 février 1971.

¹¹ Nous désirons exprimer notre gratitude à Monsieur et Madame J. P. ROUSSEAU, de l'Institut National de Recherche agronomique qui ont bien voulu nous faire profiter de leur expérience de la technique de KOELLE et FRIEDENWALD³ pour la mise en évidence des cholinestérasées.

The Effects of Sodium Salicylate on the Anamnestic Immune Response in vitro

Divergent results have been reported concerning the effect of salicylates on the antibody response *in vivo*¹. Recently, a suppressive effect *in vivo* on the number of spleen antibody-forming cells was demonstrated in mice². AMBROSE³ showed that salicylates, when added during the 'inductive' period, inhibited the *in vitro* anamnestic immune response in rabbit lymph node fragments.

Salicylates (30/mg 100 ml) inhibited the antigen and phytohemagglutinin-induced increase of the synthesis of DNA, RNA and protein in human blood lymphocytes *in vitro*^{4,5}.

In the present communication, we have studied the relationship between this salicylate inhibition of cellular DNA synthesis and the synthesis and release of IgM and IgG antibody using the anamnestic response of immune chicken spleen cells to sheep erythrocytes (SRBC) *in vitro*.

Eight-week-old white leghorn chickens were immunized i.v. with 5×10^9 sheep erythrocytes (SRBC) per kg body wt. They were sacrificed 8 days later and spleen cell suspensions were prepared and cultured as described elsewhere⁶. In brief, tightly stoppered tube cultures containing 15×10^6 spleen cells in 2 ml Waymouth's MB 752/1 medium supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and homologous chicken serum (15%) were used. The gas phase was 5% CO₂-95% air and the culture temperature 37.5°C. Half of the cultures received 10^7 SRBC each.

The incorporation of H³-methyl-thymidine (H³-TdR), indicating the DNA synthesis of the cultures, was determined daily as previously described⁷. Antibody-producing, plaque-forming cells (PFCs) in the cultures were determined by the direct and the indirect versions of the Jerne technique⁸ as previously described⁷.

Sodium salicylate (Matheson, Coleman and Bell, Cincinnati, Ohio, USA) was added to the cultures to a final concentration of 34.8 mg/100 ml (2.17 mM). The effects of the drug during a 5-day-culture period is illustrated by one typical experiment; 5 experiments were performed in all.

Figure 1 demonstrates the effects of salicylate on the H³-TdR incorporation in cultures with and without SRBC antigen. Cultures with antigen were more inhibited than cultures without antigen. Salicylate decreased the magnitude of the H³-TdR incorporation, while the rate of increase, which was approximately logarithmic, was unchanged.

Figure 2 shows the antigen-induced increase in the number of direct PFCs (IgM) and indirect PFCs (antibodies of low hemolytic efficiency, presumably mostly

IgG). Cultures without antigen contained practically no PFCs. The number of direct PFCs increased, with time, in approximately logarithmic progression. Salicylate strikingly decreased the number of direct PFCs (proportionately more than the H³-TdR incorporation) but the

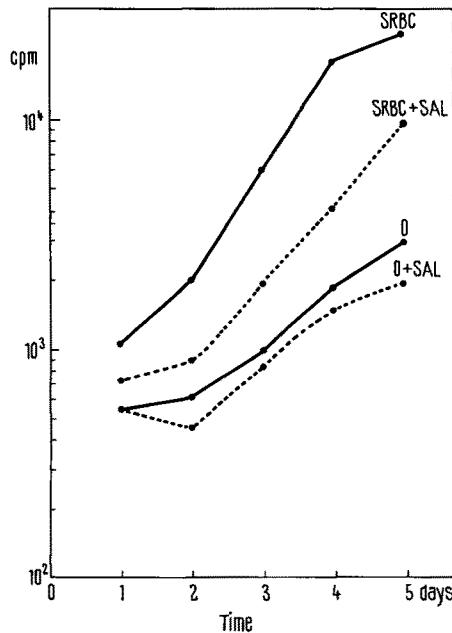


Fig. 1. The effect of sodium salicylate (SAL) on the H³-TdR incorporation (counts per min) in cultures with and without SRBC.

- K. F. AUSTEN, *Salicylates* (Little, Brown and Co., Boston 1963), p. 161.
- E. GRISWOLD and M. UYEKI, *Eur. J. Pharmac.* 6, 56 (1969).
- C. T. AMBROSE, *J. exp. Med.* 124, 461 (1966).
- L. M. PACHMAN, N. B. ESTERLY and R. D. A. PETERSON, *Fedn Proc.* 28, 294 (1969).
- L. M. PACHMAN, N. B. ESTERLY and R. D. A. PETERSON, *J. clin. Invest.*, in press.
- G. V. ALM, Thesis, University of Uppsala (1970).
- G. V. ALM and R. D. A. PETERSON, *J. exp. Med.* 129, 1247 (1969).
- N. K. JERNE, A. A. NORDIN and C. HENRY, in *Cell Bound Antibodies* (Eds. B. AMOS and H. KOPROWSKI; Wistar Institute Press, Philadelphia 1963), p. 109.