

level was between 150 and 250 mg/100 ml. In 5 cases haemoglobin-2-¹⁴C and in 3 cases haemoglobin-1-¹⁴C was administered. The experimental conditions were the same as in the previous report⁴. Urine samples were collected at hourly intervals. All 8 experiments were done with male dog kidneys. In order to separate the labeled urinary haemoglobin and bilirubin, gel chromatography with sephadex G-50 was performed (according to VAN DER STOCK and DE SCHEPPER, in preparation), using caffeine sodium benzoate 0.1 M as the elution solvent. A typical result is given in the Figure. In each eluted fraction we measured the radioactivity (DPM/ml), the haemoglobin concentration, the extinction of bilirubin at 455 nm, the extinction at the 587 nm of the sulfanilic diazonium salts of bilirubin and the extinction at 530 nm of the extracted azopigments of ethylanthranilate with aethylpropylketone/butylacetate (17:3).

In the first radioactive fractions (No. 7 to 15), we found the radioactive haemoglobin in the void volume of the column. After this, a yellow product with an absorption maximum at 455 nm was eluted with a radioactive maximum at fraction number 26. In all fractions between fraction 24 and 28, there was a very good correlation between the course of the results of the total radioactivity, of the extinction at 455 nm and the extinction at 587 nm of the diazonium salts of sulfanilic acid. In another run of the same urine sample, we found at the same place a close correlation between the course of the results of the radioactivity, of the extinction at 530 nm, of the extracted azopigments of ethylanthranilate and of the radioactivity of the extracted azopigments of ethylanthranilate. In the 3 experiments with haemoglobin-1-¹⁴C from which we know that the carboxyl carbon atom is not utilized for synthesis of the haeme group⁵, the results were in complete agreement, except that there was no radioactivity at the extinction 455 nm fraction.

The absorption characteristics in the visible range, the positive significant correlation at the highest observations (fraction 24 to 28) after the administration of haemoglobin-2-¹⁴C between the course of the results of the total radioactivity, of the extinction at 455 nm, of the extinction at 587 nm, of the diazonium salts of sulfanilic acid, of the extinction at 530 nm of the extracted azopigments of ethylanthranilate and of the radioactivity of the extracted diazonium salts of ethylanthranilate, as also the fact that the yellow eluate is not radioactive after administration of haemoglobin-1-¹⁴C, indicates that the measured yellow substance was identical with bilirubin, from which we know that it is a radioactive decomposition product of haemoglobin-¹⁴C⁶. So our results prove the formation of bilirubin from haemoglobin in the male dog kidney during haemoglobinuria.

Résumé. L'hémoglobine libre du sang, filtrée par les glomérules rénaux et partiellement absorbée par les tubules, est métabolisée par le tissu renal. A l'aide de l'hémoglobine marquée en ¹⁴C, formée à partir de la glycine-2-¹⁴C et de la glycine-1-¹⁴C nos résultats prouvent que chez le chien mâle les reins métabolisent l'hémoglobine en bilirubine conjuguée et excrètent cette dernière dans les urines.

J. VAN DER STOCK and J. DE SCHEPPER⁷

University of Ghent, Veterinary Faculty,
Casinoplein 24, B-9000 Ghent (Belgium), 6 October 1972.

⁶ N. S. RADIN, D. RITTENBERG and D. SHEMIN, J. biol. Chem. 184, 745 (1949).

⁷ Our thanks are due to the 'Fonds voor wetenschappelijk geneeskundig onderzoek' of Belgium for the financial support.

Transport synaptosomal du Tryptophane et de la Tyrosine cérébrale. Existence de systèmes de capture d'affinité différente

L'analyse des facteurs qui contrôlent les concentrations intraneuronales des précurseurs des monoamines représente un aspect fondamental de l'étude de la régulation de leur synthèse: c'est ainsi que des études récentes suggèrent l'importance des mécanismes de transport du tryptophane dans la régulation de la synthèse de la sérotonine (5 HT)¹⁻⁶. Ces phénomènes de capture ont déjà été étudiés sur des fractions purifiées de synaptosomes isolées à partir de cerveaux de rats^{2,7}. Cependant les mécanismes de la régulation de ce transport sont encore mal connus. Ce travail consiste en une étude des variations des caractéristiques cinétiques du système de capture du tryptophane (Trp) et de la tyrosine (Tyr) par les synaptosomes consécutives aux changements de concentrations extra-cellulaires de ces amino-acides.

Matériel et méthode. Ces expériences sont réalisées sur des rats mâles de souche OFA pesant 200 à 250 g. Les animaux sont sacrifiés par décapitation et leur cerveau prélevé. Le mésencéphale est rapidement disséqué⁸. A partir de 5 à 10 de ces structures rassemblées, une fraction purifiée de synaptosomes est préparée par centrifugation sur gradient de densité de saccharose^{2,9}. Après son isolement la fraction particulée contenant les synaptosomes est mise en suspension dans un milieu physiologique à pH 7,4 contenant: NaCl, 0,12 M; KCl, 2,4 mM; CaCl₂, 2 H₂O, 1,1 mM; MgCl₂, 6 H₂O, 0,83 mM; KH₂PO₄, 0,5 mM; Na₂SO₄, 0,51 mM; acide ascorbique, 0,56 mM; glucose, 5,35 mM, NaHCO₃, 0,028 mM pour 1 l d'eau bidistillée.

Ce milieu est saturé d'un mélange d'O₂-CO₂ (96-4 V/V). 500 µl de cette suspension sont placés dans un bain-marie à 37°C et préincubés à l'air durant 1 min. 500 µl du milieu à 37°C et contenant du L-(méthylène ¹⁴C) tryptophane (46 mCi/mM) ou de la L-tyrosine ¹⁴C (10 mCi/mM) (The Radiochemical Centre, Amersham) sont ensuite ajoutés au milieu d'incubation. Si cela est nécessaire, la concentration initiale du Trp est ajustée à l'aide de Trp non radioactif (Calbiochem).

A la fin de la durée de l'incubation les synaptosomes sont séparés du milieu par filtration sur filtre millipore d'une porosité de 0,65 µm². Les filtres sont ensuite lavés par 2 fois 2 ml de la solution physiologique à 2°C. Leur radioactivité est alors déterminée par scintillation liquide². Une analyse chromatographique réalisée à partir des

¹ F. HERY, J. F. PUJOL, M. LOPEZ, J. MACON et GLOWINSKI, Brain Res. 21, 391 (1970).

² D. G. GRAHAME-SMITH et A. G. PARFITT, J. Neurochem. 17, 1339 (1970).

³ D. G. GRAHAME-SMITH, J. Neurochem. 18, 1053 (1971).

⁴ A. T. B. MOIR et D. ECCLESTON, J. Neurochem. 15, 1093 (1968).

⁵ A. TAGLIAMONTE, P. TAGLIAMONTE, J. PEREZ-CRUET, S. STERN et G. L. GESSA, J. Pharmac. exp. Ther. 177, 475 (1971).

⁶ L. J. WEBER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 123, 35 (1966).

⁷ M. KAROBATH, J. L. DIAZ et M. HUTTUNEN, Biochem. Pharmac. 27, 1245 (1972).

⁸ J. GLOWINSKI et L. L. IVERSEN, J. Neurochem. 13, 565 (1966).

⁹ E. G. GRAY et V. P. WHITTAKER, J. Anat. 96, 79 (1962).

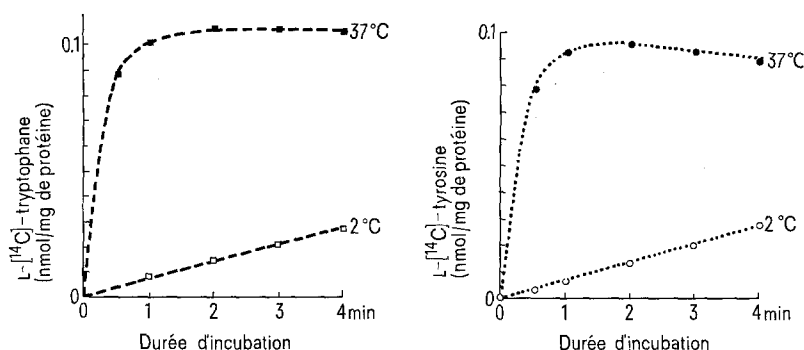


Fig. 1. Cinétique de la capture du L- 14 C-tryptophane et de la L- 14 C-Tyrosine à 2°C et 37°C, la concentration initiale dans le milieu d'incubation étant de 3×10^{-6} M/l. Chaque point représente la moyenne de 5 échantillons.

filtres après une extraction par 1 ml d'un mélange méthanol-HCl 0,1 N (95-5 V/V)¹⁰ montre que plus de 90% de la radioactivité correspond effectivement au Trp radioactif. Les blancs sont réalisés en mesurant la capture du Trp par des échantillons identiques incubés à 2°C. La détermination du taux de protéines s'effectue par spectrofluorimétrie sur des quantités aliquotes de la suspension de synaptosomes¹¹.

Résultats et discussion. A 37°C et pour une concentration initiale de $3 \mu\text{M/l}$, le L-Trp et la L-Tyr sont rapidement captés par la fraction particulée contenant les synaptosomes. Dans nos conditions expérimentales un état d'équilibre est rapidement atteint (entre 1 et 2 min). Une faible radioactivité est mesurée dans les synaptosomes incubés à 2°C et correspond vraisemblablement à un phénomène de diffusion (Figure 1).

Les effets des concentrations extracellulaires initiales du L-Trp et de la L-Tyr sont étudiés sur une même suspension de synaptosomes dans un intervalle de concentration compris entre 3×10^{-6} et 2×10^{-3} M/l.

On constate que: 1. Pour des concentrations initiales de tryptophane comprises entre $2,59 \times 10^{-4}$ et 20×10^{-4} M/l (intervalle C, Figure 2), le système de capture présente une basse affinité avec un km apparent de $1,75 \times 10^{-3}$ M/l et une vitesse maximum (V_m) de 7,44 nmoles/mg de protéines/min. Pour une concentration de 10^{-3} M/l cette vitesse de capture est estimée à 2,7 nmoles/mg de protéines/min: ces résultats sont comparables à ceux déjà

¹⁰ R. HAKANSON et G. J. HOFFMANN, *Biochem. Pharmac.* 16, 1677 (1967).

¹¹ W. LOGAN et S. SNYDER, *Brain Res.* 42, 413 (1972).

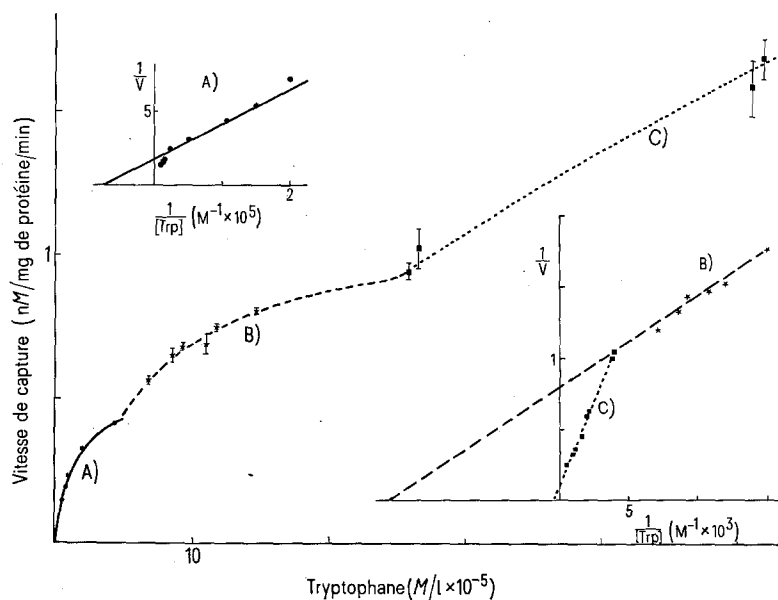


Fig. 2. La vitesse de capture du tryptophane est mesurée dans 3 intervalles de concentrations extracellulaires initiales: A) de $0,492$ à $4,26 \times 10^{-5}$ M/l. B) de $6,7$ à $14,06 \times 10^{-5}$ M/l et C) de $25,9$ à $201,6 \times 10^{-5}$ M/l. Les différentes valeurs obtenues sont portées en coordonnées de Lineweaver et Burck. Les coefficients des droites $1/V = f(1/[\text{Trp}])$ sont déterminés par la méthode des moindres carrés permettant de définir les équations suivantes:

$$\begin{aligned} \frac{1}{V_a} &= \frac{1,35 \times 10^{-5}}{0,54} \times \frac{1}{S_a} + 1,84 \quad (r = 0,99). & V_a &= \frac{0,54 \times S_a}{1,35 \times 10^{-5} + S_a} \\ \frac{1}{V_b} &= \frac{7,88 \times 10^{-5}}{1,23} \times \frac{1}{S_b} + 0,812 \quad (r = 0,72). & V_b &= \frac{1,23 \times S_b}{7,88 \times 10^{-5} + S_b} \\ \frac{1}{V_c} &= \frac{175 \times 10^{-5}}{7,44} \times \frac{1}{S_c} + 0,134 \quad (r = 0,97). & V_c &= \frac{7,44 \times S_c}{175 \times 10^{-5} + S_c} \end{aligned}$$

Chaque mesure est la moyenne de 3 à 4 échantillons. Les barres verticales représentent pour chaque mesure l'erreur standard de la moyenne.

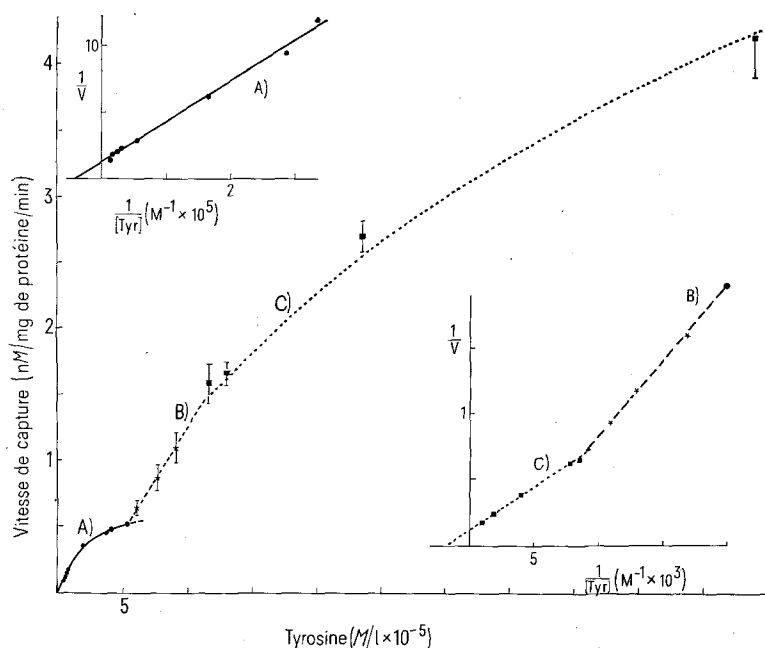


Fig. 3. La vitesse de capture de la tyrosine est mesurée dans 3 intervalles de concentrations extracellulaires initiales A) de 0,3 à 5,2 $10^{-5} M/l$. B) de 6 à 9,1 $10^{-5} M/l$ et C) de 11,6 à 103,5 $10^{-5} M/l$. Les différentes valeurs obtenues sont portées en coordonnées de Lineweaver et Burck et les coefficients des droites $1/V = f(1)/(S)$ sont déterminés par la méthode des moindres carrés permettant de définir les équations suivantes:

$$\frac{1}{V_a} = \frac{2,23 \times 10^{-5}}{0,72} \times \frac{1}{S_a} + 1,39 \quad (r = 0,98). \quad V_a = \frac{0,72 \times S_a}{2,23 \times 10^{-5} + S_a}$$

$$\frac{1}{V_c} = \frac{58 \times 10^{-5}}{8,79} \times \frac{1}{S_c} + 0,117 \quad (r = 0,95). \quad V_c = \frac{8,79 \times S_c}{58 \times 10^{-5} + S_c}$$

obtenus par d'autres auteurs sur des fractions de synaptosomes préparées à partir de cerveaux entiers².

Dans un intervalle de concentrations identiques (Figure 3, partie C) la tyrosine présente également un système de capture de basse affinité caractérisé par un K_m apparent de $0,58 \cdot 10^{-3} M/l$ pour V_m de 8,79 nmoles/mg de protéines/min.

2. Dans un intervalle de concentrations de Trp compris entre 3×10^{-6} et $50 \times 10^{-6} M/l$ (Figure 2, partie A) l'affinité du système de capture est environ 100 fois plus élevée avec un K_m apparent de $1,35 \times 10^{-5} M/l$ et un V_m de 0,54 nmole/mg de protéines/min. Ceci permet de remarquer que dans ces nouvelles conditions le gradient entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires du Trp augmente puisque la quantité de Trp captée diminue dans un rapport d'environ 1:13 quand les concentrations extracellulaires diminuent dans le rapport de 1:100.

Pour des concentrations de tyrosine comprises entre 3×10^{-6} et $52 \times 10^{-6} M/l$ (Figure 3, partie A) le K_m apparent est de $2,23 \times 10^{-5} M/l$ et le V_m de 0,72 nmole/mg de protéines/min, ce qui montre également l'existence d'un système de haute affinité.

3. La zone de concentrations intermédiaires entre les systèmes de haute et basse affinité donne pour le Trp (Figure 2, partie B) une transition qui semble correspondre à une affinité intermédiaire de K_m apparent $7,88 \times 10^{-5} M/l$ pour un V_m de 1,23 nmole/mg de protéines/min. Pour la Tyr cette zone de transition (Figure 3, partie B) ne semble pas correspondre à une cinétique Michaelienne.

Ces résultats peuvent suggérer les hypothèses suivantes: a) Le Trp et la Tyr pourraient être des effecteurs de leur propre système de capture dans le cadre d'un système de transport unique: on remarque que le passage au système de haute affinité a lieu pour une concentration voisine de $5 \times 10^{-5} M/l$ pour le Trp et la Tyr. Or, dans les conditions

normales les concentrations cérébrales de Trp et de Tyr sont respectivement de 24×10^{-9} et de $62,4 \times 10^{-9} M/g$. Il est donc possible d'envisager l'intervention d'un tel mécanisme dans des conditions physiologiques.

b) L'existence de plusieurs systèmes d'affinités différentes pourrait résulter de la mise en jeu de plusieurs compartiments enzymatiques constituant le système de transport synaptosomal.

c) Il est également possible d'envisager comme l'ont suggéré LOGAN et SNYDER^{11,12} pour l'acide aspartique et glutamique l'existence de populations de synaptosomes spécifiques responsables des cinétiques à hautes affinités. Ces groupes de terminaisons nerveuses pourraient en particulier correspondre aux synaptosomes des cellules qui utilisent le Trp ou la Tyr comme précurseur des monoamines^{13,14}.

Summary. The existence of low and high affinity systems for tryptophan and tyrosine uptake by synaptosomes were demonstrated in vitro in the rat mesencephalon.

MARIE-FRANÇOISE BELIN et J.-F. PUJOL^{15,16}

Département de Médecine Expérimentale,
Faculté de Médecine, 8, Avenue Rockefeller,
F-69 Lyon 8 (France), 8 Septembre 1972.

¹² W. LOGAN et S. SNYDER, *Nature*, Lond. 234, 297 (1971).

¹³ S. UDENFRIEND, *Molecular Biology* (Eds. N. O. KAPLAN et H. A. SCHERGA; Academic Press, London 1972), vol. 3, p. 191.

¹⁴ A. WOFSEY, M. KUHARS et S. SNYDER, *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 68, 1102 (1971).

¹⁵ Ce travail réalisé dans le laboratoire du Professeur M. JOUVET a bénéficié de l'aide de l'I.N.S.E.R.M. (No. U-52), de la D.R.M.E. (contrat No. 72-108) et du C.N.R.S. (Laboratoire associé No. 162).

¹⁶ Nous remercions tout particulièrement Mme G. VEUILLET et Mme R. JURUGUEN pour leur précieuse aide technique.