

Such a conclusion offers a satisfactory explanation of the disturbance observed in diphtheria intoxicated animals, i.e. the reduced hypophosphataemia after glucose charge in spite of the normal hexokinase activity.

Moreover, since the formation of ~P occurs chiefly in the mitochondria, it appears very probable that the metabolic alteration may be in relation to the known mitochondrial changes observed in cells in cloudy swelling.

A. FONNESU and CLARA SEVERI

Institute of General Pathology, University of Perugia, Italy, February 25, 1953.

Riassunto

Negli organi in rigonfiamento torbido sperimentale da tossina difterica l'attività escinastica è immodificata, mentre è rallentata la formazione di ~P. Ciò spiega perchè, negli animali intossicati con tossina difterica, il carico di glicosio determina ipofosfatemia meno netta. La diminuita formazione di ~P viene messa in rapporto con le alterazioni mitocondriali osservate nelle cellule in rigonfiamento torbido.

Essais d'inhibition de l'action inflammatoire cutanée du chloroforme chez le rat

L'application du chloroforme sur la peau du lapin provoque à l'endroit irrité l'apparition des colorants vitaux préalablement injectés par voie intraveineuse. AMBROSE et DE EDS ont donné au phénomène une expression quantitative fonction de sa période latente¹. Dans une note antérieure², nous avons signalé l'influence de la cortisone, de l'A.C.T.H. et des salicylés sur le délai d'apparition des colorants au niveau de la peau irritée conformément à la technique originale de ces auteurs. Aujourd'hui, nous adapterons au rat le test d'AMBROSE et DE EDS et étudierons ses variations sous

¹ A. AMBROSE et F. DE EDS, J. Exp. Pharmacol. Therap. 90, 359 (1947).
² H. VAN CAUWENBERGE et J. LECOMTE, Exp. 8, 469 (1952).

Tableau I

Lots	Nombre d'essais	Délai moyen en secondes	σ de la moyenne*	θ coefficient de Bernoulli•
Témoins . . .	48	456	201	
A.C.T.H. . . .	68	253	84	0,99
Cortine	34	306	107	0,69
Cortisone . . .	36	340	179	0,46
Salicylate . . .	16	678	218	0,79
	16	>7200	—	—
Phénergan . .	27	1197	770	0,93

l'influence d'agents hormonaux ou pharmacodynamiques doués, selon la littérature, de propriétés antiinflammatoires. Nous rechercherons aussi chez cet animal l'influence de la surrénalectomie sur l'apparition du colorant au niveau des téguments irrités par le chloroforme.

Technique. Nous utilisons des rats adultes albinos, d'un poids moyen de 150 g provenant de deux élevages différents. Aucune différence entre les lots n'a été constatée.

1° La peau du dos est rasée la veille de l'expérience. Le lendemain, les rats reçoivent, par voie intrapéritonéale, 1 ml d'une solution de chlorazol blue sky, à 1 % dans du sérum physiologique. Trois heures après, les animaux sont fixés sur le ventre. Un tampon de papier filtre de 2 cm² environ, imbibé de chloroforme et rapidement essoré, est appliqué fermement sur la peau durant 30 s. Un chronomètre est alors mis en marche et le temps minimum nécessaire pour qu'apparaissent les premières traces de coloration bleuâtre au niveau du derme est noté.

Deux tests sont pratiqués sur le même animal, de façon symétrique par rapport à la colonne vertébrale.

2° Les substances suivantes ont été administrées avant de pratiquer le test au chloroforme.

A.C.T.H.: 1 mg/100 g de poids du corps par voie intramusculaire deux fois par jour pendant 48 h.

Extrait cortical total: 0,25 ml de Cortine Organon (1 ml = 50 g de glande fraîche), une fois par jour, durant 48 h.

Cortisone: 1 mg/100 g de poids du corps, deux fois par jour, pendant 48 h, par voie intramusculaire.

Salicylate de soude: 300 mg/kg de poids du corps, deux fois par jour par voie intrapéritonéale, pendant 48 h.

Pour ces quatre produits, la dernière injection a lieu au moment de l'injection intrapéritonéale du colorant.

Phénergan: 5 mg par voie intramusculaire et 5 mg par voie souscutanée lors de l'injection du bleu.

3° La surrénalectomie a été pratiquée par voie dorso-lombaire sous courte anesthésie à l'éther, la veille de l'administration du bleu. Certains animaux surrénalectomisés ont reçu de l'extrait cortical total à raison de 0,5 ml de Cortine Organon au moment de l'intervention. Chez d'autres qui ont reçu la même dose de Cortine au moment de la surrénalectomie, 300 mg/kg de salicylate de soude ont été injectés par voie intrapéritonéale au moment de l'administration du colorant vital.

Résultats. 1° Les tableaux I et II mentionnent, exprimés en secondes, les délais moyens d'apparition de la coloration bleuâtre au niveau du derme irrité.

2° La surrénalectomie entraîne une mortalité importante des animaux injectés de bleu, plus encore des animaux injectés simultanément de bleu et de salicylate de soude. La Cortine prolonge nettement la survie des animaux injectés.

Tableau II

Lots	Opérés	Décès	Nombres d'essais	Délai moyen en secondes	σ de la moyenne*	θ coefficient de BERNOLLI •
Témoins	0	0	48	456	201	—
Surrénalectomie	22	15	14	>7200	—	—
Surrénalectomie + Cortine	14	2	24	1296	422	1,81
Surrénalectomie + Cortine + Salicylate	12	6	12	1853	363	1,97

* σ : écart statistique: $\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2/n}$. • θ : coefficient de probabilité: $X^1 - \bar{X} / \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$.

L'influence de la surrénalectomie figure dans le Tableau II.

Discussion. 1° Les hormones corticotropes et surrénales n'ont aucune influence inhibitrice sur le délai d'apparition du bleu. La fixation de ce colorant paraît même meilleure lorsque l'animal a été traité par Cortine, cortisone ou A.C.T.H.

Le Phénergan allonge le temps d'apparition. Il est impossible de décider s'il s'agit d'une neutralisation des effets de l'histamine cutanée libérée par le chloroforme. L'administration dermique d'histamine provoque en effet la fixation locale du bleu. Le salicylate de soude est l'agent qui retarde le plus le passage extravasculaire du colorant, même, semble-t-il, après surrénalectomie.

2° Les résultats que nous a donnés l'A.C.T.H. chez le rat sont en discordance avec ceux notés antérieurement chez le lapin. En effet, les valeurs observées chez ce dernier animal injecté de l'hormone corticotrope pour le délai d'apparition du bleu se divisent en deux groupes: des valeurs voisines de la normale d'une part, des valeurs fortement prolongées d'autre part (VAN CAUWENBERGE et LECOMTE, *loc. cit.*).

Nous n'avons observé chez les rats traités par A.C.T.H. que des valeurs voisines de la normale. Par contre, l'emploi du salicylate de soude divise, chez le rat comme chez le lapin, les animaux en deux groupes: l'un où les chiffres relevés sont modérément augmentés par rapport aux témoins, l'autre où la coloration n'apparaît pas dans la peau irritée après deux heures et plus, bien que le bleu soit passé dans le sang de l'animal.

Ces faits sont en accord avec les résultats de nos essais chez le rat surrénalectomisé, injecté ou non de salicylate de soude par voie intrapéritonéale. Ils constituent, pensons-nous, la première démonstration certaine d'une action *in vivo* du salicylate de soude qui ne soit pas déterminée par une activation du système hypophyso-surrénalien.

3° La surrénalectomie fait disparaître toute fixation locale du bleu. L'administration de Cortine à fortes doses corrige partiellement les effets de l'ablation des glandes surrénales. La fixation du bleu paraît donc sous la dépendance des hormones cortico-surrénaliennes.

H. VAN CAUWENBERGE
J. LECOMTE et J. GOBLET

Institut de clinique et de pathologie médicales de l'Université et Fonds national de la Recherche scientifique, Liège, le 3 juillet 1953.

Summary

(1)–In the rat, total extracts of cortex, cortisone and A.C.T.H. do not retard the fixation of a vital colorant at the level of a cutaneous zone irritated by chloroform.

(2)–Phenergan prolongs the delay in the appearance of the blue.

(3)–Sodium salicylate selectively inhibits the inflammatory cutaneous action of chloroform, even after adrenalectomy.

Interrelationship between Vitamin B₁₂ and Pantothenic Acid in the Metabolism of "Wild" Strains of *Escherichia coli*

The absorption of vitamin B₁₂ by cells of *Escherichia coli* was demonstrated in 1951 by BURKHOLDER¹. The

importance of this phenomenon in the etiology of Addisonian pernicious anemia was emphasized by BURKHOLDER¹ and by HOFF-JØRGENSEN² and his co-workers in 1952. The effect of this absorption on the ability of *Escherichia coli* to synthesize other members of the vitamin B group has not yet been studied.

The author's purpose in carrying out this work was to study the effect of vitamin B₁₂ on the biosynthesis of other vitamins B in "wild" strains of *E. coli* because of the importance of this disturbance of the equilibrium between B-group vitamins, especially in the intestinal synthesis of vitamins.

In these tests the medium described by BURKHOLDER³ for the microbiological determination of vitamin B₁₂ was used as nutrient fluid. In the first tests the following modification of this medium was used:

Ammonium tartrate.	7 g
Ammonium sulphate	3 g
Dibasic potassium phosphate . . .	2 g
Lactose	5 g
Vitamin-free Casamino acids (Difco)	1 g
Aqua dest. ad 1000 ml, pH adjusted to	6.5

250 ml of this medium was pipetted into three ERLLENMEYER bottles and sterilised. Vitamin B₁₂ was added to the bottles as follows:

Bottle No. 1, Vitamin B ₁₂ . . .	0.0 γ
Bottle No. 2, Vitamin B ₁₂ . . .	7.5 γ
Bottle No. 3, Vitamin B ₁₂ . . .	15.0 γ

All the bottles were inoculated with one drop of a fresh culture of a "wild" strain of *E. coli*, isolated from human faeces. After 72 h incubation at 37°C, the living cells were harvested with a centrifuge at 5000 r.p.m.

From the clear supernatant fluid the following members of vitamin B group were determined: Nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid and biotin. The methods published in 1951 by the Association of Vitamin Chemist's were used in all the assays.

Folic acid was estimated using *Streptococcus faecalis* as test organism, while the other vitamins were assayed with *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (Table I).

The addition of 2 g of asparagine, 0.2 g of sodium citrate, 0.1 g of potassium chloride, 0.2 g of magnesium sulphate and 50 mg of *dl*-tryptophane, and the substitution of the lactose of the medium by glucose could not effect the synthesis of pantothenic acid when this strain of *E. coli* was used in the experiments.

The synthesis of the above-mentioned members of the vitamin B group was not influenced by the addition of vitamin B₁₂ to the growth media. The synthesis of pantothenic acid was first discovered in a medium in which the growth conditions for *E. coli* were considerably better. The medium used by the author was that proposed in 1951 by BURKHOLDER³ as mentioned above.

In the first tests, 20 ml of this medium was pipetted into four test tubes. The addition of vitamin B₁₂ was as follows: Tube No. 1, 0.0 γ; Tube No. 2, 0.5 γ; Tube No. 3, 1.0 γ; Tube No. 4, 1.5 γ.

The test proceeded as above and after 72 h' growth the cells were centrifugated off and the pantothenic acid content of the supernatant fluid was determined.

¹ P. BURKHOLDER, Arch. Biochem. Biophysic. 39, 322 (1952).

² E. HOFF-JØRGENSEN, A. P. SKOUBY, and J. GAD ANDERSEN, Nord. Med. 48, 1754 (1952).

³ P. BURKHOLDER, Science 114, 459 (1951).

¹ P. BURKHOLDER, Science 114, 478 (1951).