

50 larvae were reared. The cultures were kept in the dark in an incubator at 25°C. These larvae reared on the basal diet show a tendency to pupate after seven days. After this period the larvae were tested for contamination, killed with chloroform, dried for two days at 80°C and weighed. The nitrogen content was determined on samples of dried larvae, according to the method of KJELDAHL<sup>1</sup>. Tests for contamination were performed aerobically and anaerobically according to the usual methods on seven days old larvae. The results obtained from experiments in which contamination occurred were discarded.

This method for rearing sterile larvae proved to be successful; the contamination was only 5.5% and the eggs used to hatch about 20 h after oviposition.

Table II

Nitrogen content in mg per larva reared on a complete diet and on diets deficient in one of the vitamins tested.

Diet	Labco casein		H.L.R. casein	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Basal diet (see Table I) . . . . .	2.82	2.74	2.46	2.30
Basal diet without thiaminchloride . . . . .	0.16	0.14	0.15	+
Basal diet without riboflavin . . . . .	+*	+	+	+
Basal diet without nicotinic acid . . . . .	+	0.11	+	+
Basal diet without pyridoxin . . . . .	-**	0.03	+	+
Basal diet without Ca pantothenate . . . . .	+	0.06	0.22	+
Basal diet without folic acid . . . . .	2.53	1.68	1.81	1.30
Basal diet without cholinechloride. . . . .	0.61	0.69	0.42	+
Basal diet without biotin. . . . .	2.52	0.92	0.73	+
Basal diet without inositol. . . . .	2.68	2.47	2.56	2.58
Basal diet without vitamin B <sub>12</sub> . . . . .	2.71	2.48	2.57	2.54

\* All larvae died in an early stage.

\*\* Contaminated.

**Results and discussion.** Table II comprises the results of 4 series of experiments in which vitamin-free casein served as protein component of the diet, two series with Labco casein, the other two with vitamin-free casein Hoffmann La Roche. The figures represent the nitrogen content in mg per larva after seven days, reared on a complete diet and on diets in which each of the vitamins was omitted in turn (the Figures of the dry weight, showing essentially the same results, are omitted).

From this Table it is clear that the omission of thiamin, riboflavin, nicotinic acid, pyridoxin, pantothenic acid or choline results in very slow growth. In many cases even death occurs in an early stage of larval development. From these results we are justified in concluding that these vitamins are required for normal growth.

On replacing nicotinic acid by nicotinic amide, growth is not retarded. So it is obvious that these vitamins may replace each other.

If folic acid or biotin is omitted, growth is retarded considerably and mortality is high as compared with the

complete diet. In subsequent experiments it could be shown that this growth retardation on diets deficient in either folic acid or biotin is significant (resp. P = 0.01 and P = 0.02). So it appears that besides the vitamins mentioned above, folic acid and biotin are likewise required for normal growth.

On diets from which inositol or vitamin B<sub>12</sub> was omitted, growth was about equal to that on the complete diet. However it is probable that the other components of the diet may contain these vitamins in sufficient quantity to meet the needs for normal growth. Therefore, any conclusions regarding these two vitamins must await further experiments.

Comparing the above results with investigations from other authors as reviewed by TRAGER<sup>1</sup>, the requirements of the *Calliphora* larva for B vitamins are in good agreement with those of other insects. Especially is this the case for *Drosophila*<sup>2</sup> and *Attagenus*<sup>3</sup>, which require all the vitamins which proved to be likewise essential for normal growth of the larva of *Calliphora*.

**Acknowledgement.** I wish to thank Professor K. C. WINKLER for his advice about the sterile technique; Mr. A. P. DE GROOT for his help and for the correction of the manuscript; the Netherlands Organisation for Pure Research (Z.W.O.) for a grant which partly made this investigation possible; and the N.V. Organon, Oss, for providing me with biotin and vitamin B<sub>12</sub>.

PH. D. J. W. SEDEE

Laboratory of Comparative Physiology, University of Utrecht, January 10, 1953.

#### Zusammenfassung

Larven von *Calliphora erythrocephala* wurden bei semi-synthetischer Diät aus Kasein, Cholesterin, Salzen, l-Zystin, Vitaminen und Wasser steril aufgezogen. Die Verpuppung erfolgte normal, und es schlüpften normale Imagines. Für gutes Wachstum sind an Vitaminen notwendig: Aneurin, Riboflavin, Nikotinsäure oder Nikotinsäureamid, Pantothensäure, Adermin, Folsäure, Biotin und Cholin. Für gutes Wachstum und für die vollständige Entwicklung benötigt die Larve außerdem l-Zystin.

<sup>1</sup> W. TRAGER, Biol. Rev. 22, 148 (1947).

<sup>2</sup> E. L. TATUM, Proc. Nat. Acad. Sci. 27, 193 (1941). — T. HINTON, D. THEIRAUT NOVES, and J. ELLIS, Physiol. Zool. 24, 335 (1951).

<sup>3</sup> W. MOORE, Ann. Entom. Soc. Amer. 39, 513 (1946).

#### Modifications dans la figure chromatographique des acides aminés libres et des substances fluorescentes de l'hémolymphe du *Bombyx mori* L., consécutives à une paralysie d'origine microbienne

L'étude physiologique des paralysies d'origine microbienne est rendue difficile par le fait que l'on se trouve en face de complexes d'effets indirects inconnus. Il semble que la nature de ces derniers doive être recherchée surtout avec l'aide de la pathologie comparée.

C'est dans cet ordre d'idées que nous rapportons ici un effet que nous avons observé dans le bilan des acides aminés et des substances fluorescentes du sang au cours d'une paralysie provoquée chez le lépidoptère *Bombyx mori* L. par l'action d'une bactérie flachérigène, le *Bacillus cereus* var. *alesci* TOUMANOFF et VAGO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> C. TOUMANOFF et C. VAGO, C. r. Acad. Sci. 233, 1504 (1951). — C. VAGO, C. r. Acad. Agric. 37, 593 (1951).

Ce microbe introduit par voie buccale dans le tube digestif des larves de *Bombyx mori* L., provoque dans les 2 ou 3 h qui suivent, une paralysie d'abord partielle puis s'étendant à tout le corps: l'arrêt du fonctionnement des organes entraîne la mort. La rapidité des phénomènes pathologiques dépend de la concentration des bactéries ingérées, de leur stade de sporulation, du pH du milieu et de la température<sup>1</sup>.

Nous avons utilisé pour réaliser l'infection, la suspension d'une culture pure sur gélose pH 7 en pleine sporulation, de *Bacillus cereus* var. *alesii*, à raison d'une anse de platine pour 1 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Les prélevements de l'hémolymphe ont été effectués à quatre moments précis de l'évolution de la maladie dans l'organisme, à savoir:

1° Animal vivant, se déplaçant et ne montrant qu'un ralentissement des mouvements.

2° Paralysie accentuée, mais les vraies pattes ne sont pas encore atteintes.

3° Arrêt total des mouvements.

4° Animal mourant, absence de mélénisation.

La technique de la chromatographie de partage sur papier à une et à deux dimensions, nous a permis de suivre l'évolution des acides aminés et des substances fluorescentes au cours de la maladie<sup>2</sup>.

L'extraction des acides aminés en milieu alcoolique à + 4° est poursuivie pendant plusieurs jours et la technique des gouttes concentrées permet de déceler ceux qui, sous l'action du processus pathologique, n'existent plus qu'à l'état de traces.

Nous avons utilisé, comme solvant, le phénol ammoniacal en présence de CNH, l'alcool butylique, le mélange de PARTRIDGE, le système d'EDMAN, l'alcool isoamylque-pyridine-eau; les temps de passages s'échelonnent de 24 à 30 h.

La méthode ascensionnelle a donné d'excellents résultats. Les chromatogrammes sont séchés puis examinés en lumière de Wood pour l'étude des substances fluorescentes, enfin révélés à la ninhydrine et séchés à nouveau aux environs de 100°. Une température inférieure amène un jaunissement des papiers et une mauvaise visibilité des taches; les couleurs, la forme, et l'intensité de celles-ci sont notées immédiatement; les chromatogrammes de références exécutés dans les mêmes conditions de solvants et de température ambiante servent aux calculs de *R<sub>f</sub>*.

Dans les stades 1 et 2 de cette paralysie bacillaire, la totalité des acides aminés et des substances fluorescentes habituelles chez les larves saines du même âge est présente et en quantité normale. A partir du 3<sup>e</sup> stade de la maladie, la mise en évidence des acides aminés, si abondants dans les larves saines aux mêmes stades, s'avère très difficile. Il faut en effet, pour les mettre en évidence, une concentration en hémolymphe trois fois plus grande. Ceux d'entre eux qui, chez l'animal normal, sont les plus abondants, à savoir: le glycocolle, l'acide glutamique, l'alanine, la valine et les substances fluorescentes, sont devenus à peine perceptibles.

Nous donnons ici un tableau comparatif des acides aminés trouvés chez la larve normale au même stade (5<sup>e</sup> âge) et chez la larve atteinte de paralysie microbienne.

Afin de situer le phénomène dans le processus aboutissant à la paralysie, la diminution des acides aminés et des substances fluorescentes a été observée concurremment avec d'autres aspects pathologiques.

Nature des acides aminés et des substances fluorescentes	Sang normal	Sang paralysie microbienne
Cystine . . . . .	+	-
Acide glutamique . . . . .	+++	- +
Glycocolle. . . . .	+++	+
Serine . . . . .	+	-
Alanine . . . . .	++	- +
Lysine . . . . .	- +	-
Hydroxyproline . . . . .	- +	-
Tyrosine . . . . .	- +	- +
Valine . . . . .	++	- +
Tryptophane . . . . .	+	-
Leucine . . . . .	+	-
Isoleucine . . . . .	- +	-
Proline . . . . .	+	-
Histidine . . . . .	+	-(traces)
Phénylalanine . . . . .	- +	-
Acide folique . . . . .	+++	- +
Fluorescyanine. . . . .	++	+
Flavine . . . . .	- +	-

Au début des manifestations paralytiques, les changements dans le profil chromatographique sont inexistant ou minimes. Ce n'est qu'au moment de la forte attaque paralytique qu'ils deviennent importants. La diminution du taux de ces substances ne peut donc être un facteur causal.

En suivant, comparativement avec les analyses chromatographiques, les processus hémato-pathologiques, nous pouvons préciser qu'il y a coïncidence entre le début de la diminution des acides aminés et des substances fluorescentes et l'agglomération des macro- et micro-nucléocytes; la progression de cette diminution est parallèle avec l'altération de ces cellules. Les altérations consistent en une vacuolisierung du cytoplasme et un début de dissolution de la surface externe protoplasmique.

En ce qui concerne l'action bactérienne elle-même, l'effet toxique antérieur à la pullulation microbienne surtout dans les infections massives, précède légèrement les premiers changements dans le bilan des acides aminés et des substances fluorescentes de l'hémolymphe.

La progression des formes végétatives de *Bacillus cereus* var. *alesii* vers les tissus périintestinaux se produisant parallèlement avec l'effet toxique ou immédiatement après celui-ci, nous sommes amenés à considérer comme possible également une utilisation par les bactéries, même à distance, des acides aminés et des substances fluorescentes de l'hémolymphe.

En conclusion, la chromatographie de l'hémolymphe de *Bombyx mori* L. paralysé par l'action de *Bacillus cereus* var. *alesii* et les précisions hématologiques, physiopathologiques et histologiques observées parallèlement mettent en évidence un aspect particulier du processus aboutissant à la paralysie, à savoir la diminution et la disparition des acides aminés et des substances fluorescentes de l'hémolymphe, phénomène évolutif parallèlement avec les autres changements pathologiques du dit processus.

A. DRILHON et C. VAGO

Institut océanographique de Paris et Laboratoire de Pathologie de la Station de Recherches séricicoles d'Alès (I.N.R.A.), le 2 janvier 1953.

#### Zusammenfassung

Die Autoren untersuchten auf Grund der vergleichenden Pathologie die Physiopathologie der bakteriellen

<sup>1</sup> C. TOUMANOFF et C. VAGO, Ann. Inst. Pasteur. 83, 421 (1952).

<sup>2</sup> A. DRILHON, R. G. BUSNEL et C. VAGO, C. r. Acad. Sci. 232, 360 (1951).

Paralyse und beweisen mittels simultaner Chromatographie, Hämatologie und Histopathologie einen neuartigen Aspekt der Paralyse von *Bombyx mori* L. (Lepidoptera), welche von *Bacillus cereus* var. *alesti* verursacht wird, und der aus der Verminderung und dem Verschwinden der Aminosäuren und der fluoreszierenden Substanzen in der Hämolymphe hervorgeht. Dieses Phänomen entwickelt sich parallel mit den anderen pathologischen Veränderungen, welche zur Paralyse führen.

### Sur l'action contracturante des esters amides polyphosphoriques de la thiamine

L'étude préliminaire de l'action biochimique des esters amidés polyphosphoriques de la thiamine (E.A.P.P.) nous a amené à reconnaître que ceux de ces composés qui offrent de courtes chaînes polyphosphoriques sont doués d'une action glucidique tant *in vitro* qu'*in vivo*<sup>1</sup>. Il nous est, de plus, récemment apparu que les E.A.P.P. à longues chaînes polyphosphoriques étaient doués d'une action neuro-musculaire importante. Ces effets, glucidique et neuro-musculaire, paraissaient donc liés à la longueur des chaînes polyphosphoriques fixées sur la molécule de thiamine.

<sup>1</sup> H. ROUX et A. CALLANDRE, Exper. 6, 386 (1950). — H. ROUX, M. DENANS et M. FRANCILLON, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 1152 (1951).

Aussi nous avons recherché *in vivo* un test d'action biochimique lié à la longueur des chaînes polyphosphoriques. Nous l'avons trouvé dans l'étude des variations du taux de la lactacidémie du chien normal sous l'effet de l'injection intra-artérielle de différents composés polyphosphoriques.

Nous avons, en effet, étudié au préalable l'action de deux composés polyphosphoriques minéraux particulièrement simples à préparer: le pyrophosphate de sodium d'une part et le tripolyphosphate de sodium d'autre part. Ce dernier, en effet, nous fournit une crise contracturante intense analogue à celle fournie par les E.A.P.P. à longues chaînes polyphosphoriques. Le pyrophosphate de sodium fournit, par contre, une crise avec polypnée et manifestations cardiaques importantes mais sans élément contracturant, crise analogue à celle fournie par les E.A.P.P. à courtes chaînes polyphosphoriques et que nous appellerons «crise toxique».

Nous avons alors constaté que l'injection de pyrophosphate de sodium est immédiatement suivie d'une augmentation importante du taux de l'acide lactique du sang: dès la première minute cette augmentation est considérable (Tableau). Par contre le tripolyphosphate de sodium qui fournit une crise contracturante intense n'élève pas le taux de la lactacidémie à la première minute: on enregistre même une légère déflexion de ce taux. Nous avons rapproché cette déflexion de l'action inhibitrice de certains polyphosphates minéraux sur la formation de l'acide lactique par des chaînes ferment-

Taux de la lactacidémie (en  $\mu\text{g}$  par  $\text{cm}^3$  de sang) chez le chien normal avant et après injection de différents composés polyphosphoriques minéraux et organiques

Corps injecté	mm de phosphore labile par kg	Chien	Taux de la lactacidémie			% écart entre avant et après	Crise observée
			avant	1 min après injection du composé phosphorique	3 min après		
Pyrophosphate de sodium	7,5	1	320	368	575	+15	toxique
	7,5	2	216	400	433	+85	toxique
	8,5	3	212	305	268	+44	toxique
	6,5	4	64	123	—	+92	toxique
	5,0	5	364	500	560	+37	toxique
	7,5	6	470	687	600	+46	toxique
Ester Triphosphorique de B <sub>1</sub>	24	1	705	880	1000	+25	toxique
	14	2	264	435	540	+65	toxique
	15	3	545	650	685	+19	toxique
	28	4	80	150	320	+88	toxique
	20	5	353	424	516	+20	toxique
	10	6	276	444	418	+61	toxique
Tripolyphosphate de sodium	18	1	264	233	294	-12	contracturante
	10	2	430	400	600	-7	contracturante
	18	3	252	236	705	-6	contracturante
	20	4	557	324	760	-42	contracturante
	19	5	696	640	532	-8	contracturante
	20	6	322	219	221	-32	contracturante
Esters amides poliphosphoriques de B <sub>1</sub>	29	1	318	377	303	+18	toxique
	15	2	450	640	720	+42	toxique
	PH = 2	20	3	217	260	+20	mixte
	PT = 4	15	4	318	388	+22	mixte
	21	5	173	220	277	+27	mixte
	23	6	138	163	256	+18	mixte
PH = 3	21	1	212	153	505	-23	contracturante
	15	2	320	600	540	+82	contracturante
	PT = 5	14	3	297	329	+10	contracturante
	PH = 4	25	1	255	209	-18	contracturante
	18	2	169	143	165	-15	contracturante
	PT = 6	15	3	300	279	455	-7
PH = 5	24	1	440	—	377	-14	mixte avec contracture violente
	PT = 7	7	2	485	398	398	