

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 ERLÉNMEYER 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).

Table I Results

	Vitamin B ₁₂ in γ per ml of medium	Synthesized vitamins in γ per ml of medium			
		Nicotinic acid	Pantothenic acid	Folic acid	Biotin
Bottle No. 1 . . .	0.00	0.06	none	0.005	0.0008
Bottle No. 2 . . .	0.03	0.06	none	0.005	0.0008
Bottle No. 3 . . .	0.06	0.05	none	0.005	0.0006

A second test was made with the same strain of *E. coli* and with the same growth medium. Another strain of *E. coli*, also isolated from human faeces, was used in this experiment. It was observed that the

effect of added vitamin B₁₂ is not so dramatic as in earlier series.

To avoid the influence of the nutrient medium, the following test with strain No. 1 was also conducted. The growth medium for *E. coli* used in these experiments contained the following substances:

Vitamin-free Casamino acids (Difco) .	2 g
Peptone (Difco)	20 g
Lactose	10 g
Sodium chloride	0.5 g
Aqua dest. ad 1000 ml, pH adjusted to	6.3

After sterilisation, an inoculation with cells of strain No. 1 was made. After 72 h' growth the cells were harvested with a Sharpless supercentrifuge and washed with saline solution. The washed cells were suspended in saline solution. This suspension contained $4 \cdot 10^9$ cells per ml. 6 ml of this suspension was pipetted aseptically into each of two sterilized centrifuge tubes. To one of the tubes 0.5 γ vitamin B₁₂ on 0.5 ml saline solution was added under aseptic conditions, and to the other tube a corresponding amount of saline. The tubes were incubated for 12 h at 37°C, after which the pantothenic acid content of the tubes was determined.

Table II Results

	Vitamin B ₁₂ in γ per ml of medium	Synthesized pantothenic acid in γ per ml of medium
Tube No. 1 ..	0.00	0.06
Tube No. 2 ..	0.025	0.03
Tube No. 3 ..	0.05	none
Tube No. 4 ..	0.075	none

ability of this strain to synthesize pantothenic acid was considerably greater than that of strain No. 1. Before centrifugation the turbidity of the suspensions was measured with a PULFRICH photometer.

Table III Results

	Vitamin B ₁₂ in γ per ml of medium	Turbidity of the suspensions in 0.5 cm cuvette	Synthesized pantothenic acid in γ per ml of medium
Strain No. 1	0.00	0.62	0.01
	0.03	0.59	0.007
	0.06	0.63	none
Strain No. 2	0.00	0.66	0.1
	0.03	0.62	0.08
	0.06	0.61	none

The results show a very clear inhibition in the synthesis of pantothenic acid caused by the addition of vitamin B₁₂.

A third strain of *E. coli* was also tested in this respect. The results in this test show a clear decrease in the amount of synthesized pantothenic acid, although the

Table IV Results

Vitamin B ₁₂ in γ per ml of medium	Turbidity in 0.5 cm cuvette	Synthesized pantothenic acid in γ per ml of medium
0.00	0.82	0.07
0.03	0.82	0.06
0.06	0.82	0.04

The turbidity of 0.82 observed in all the suspensions corresponded to 3.2×10^9 cells per ml.

Table V Results

	Vitamin B ₁₂ in the tube	Pantothenic acid in the tube
Tube No. 1 . . .	0.00 γ	0.42 γ
Tube No. 2 . . .	0.5 γ	0.24 γ

The results in this series verify the earlier observations in this study.

In all the tests the growth of *E. coli* was approximately the same in the corresponding test series. However, the synthesis of pantothenic acid was very clearly decreased or completely blocked by the addition of vitamin B₁₂ to the media. The synthesis of other investigated members of the vitamin B group, i.e. nicotinic acid, folic acid and biotin, was not influenced in any way by the addition of vitamin B₁₂. It was observed that the same concentration of vitamin B₁₂ effected an unequal inhibition of pantothenic acid synthesis in the different strains. Further it was noted that the inhibition of pantothenic acid synthesis was greatest when the used strains were fresh and had not been kept very long on stab agar cultures.

In this connection it is noteworthy that EVANS¹ and his co-workers, YACOWITZ² and his coworkers, and

¹ R. J. EVANS, A. C. GROSCHE, and H. A. BUTTS, Arch. Biochem. Biophys. 31, 454 (1951).
² H. YACOWITZ, L. C. NORRIS, and G. F. HEUSER, J. Biol. Chem. 192, 141 (1951). – Vitamin Methods (Interscience Publishers, New York, 1951), p. 180, 205, 231, 243.

WELCH and COUCH¹ observed in 1951 an interrelationship between vitamin B₁₂ and pantothenic acid in chicken liver cells. The nature of this phenomenon is still unexplained.

The phenomenon observed by the author has also no explanation, but because of its biological importance it deserves more investigation.

J. JÄNNES

Department of Medical Chemistry, University of Helsinki, July 4, 1953.

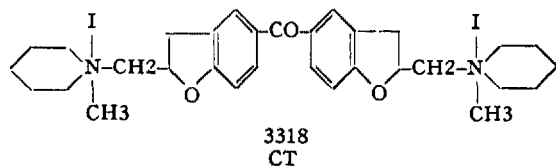
Zusammenfassung

Drei «wilde» Stämme von *Escherichia coli* wurden auf vitaminfreien Nährböden gezüchtet. Zusatz von Vitamin B₁₂ in Konzentrationen von 0,03 bis 0,06 γ je ml ergab bei verschiedenen Stämmen eine ungleiche Hemmung der Pantothenäure-Synthese. Die eindeutigsten Resultate wurden mit frischen Stämmen erzielt, die nur kurz auf Agar gezüchtet wurden.

¹ B. E. WELCH and J. R. COUCH, Abstracts Amer. Chem. Soc. Southwest Regional Meeting 35-36 (Austin, Texas, Dec. 1951), cited by A. D. WELCH, and C. A. NICHOL in Ann. Rev. Biochem. 1952 Stanford, Calif. p. 674.

Sur l'inhibition sélective des acétylcholinestérases *in vivo* chez le chien

HAWKINS et MENDEL¹ ont récemment décrit un agent anticholinestérasique, le N-p-chlorophényl-N-méthylcarbamate de m-hydroxy-phényl-triméthylammonium (Nu-1250) grâce auquel ils ont, chez le rat, inactivé les acétylcholinestérases (AcChE) plasmatiques sans inhiber les cholinestérases non spécifiques de l'acétylcholine (XChE); dans ces conditions ils ont observé l'apparition de différents symptômes acétylcholinomimétiques et ils ont conclu, de ce fait, que les XChE n'ont aucun rôle, même auxiliaire, dans l'hydrolyse *in vivo* de l'acétylcholine. Il eût convenu, pour étayer cette conclusion, de réaliser des expériences similaires chez des animaux se prêtant à des analyses pharmacologiques plus détaillées, mais le Nu-1250 s'avéra, chez le chien, dépourvu d'activité antiacétylcholinestérasique sélective (CASIER et DE VLEESCHOUWER²).



¹ R. D. HAWKINS et B. MENDEL, Biochem. J. 44, 260 (1949).

² H. CASIER et G. R. DE VLEESCHOUWER, Arch. int. Pharmacodyn. 90, 412 (1952).

La synthèse, par FUNKE et VON DÄNIKEN¹, d'un nouvel antiacétylcholinestérasique², le di-iodométhylate de la bis(pipéridinométhylcoumaranyl-5) cétone (3318 CT), nous a permis d'entreprendre une étude de l'inhibition préférentielle des AcChE chez le chien, et nous résumons ici les résultats observés jusqu'à présent.

I.—Activités anticholinestérasiques du 3318 CT

a) *Essais in vitro* (Tableau I). Les expériences ont été réalisées avec la méthode de WARBURG-AMMON³, et cela dans des conditions classiques, en utilisant l'acétylcholine elle-même comme substrat. — Comme le Nu-1250, le 3318 CT inhibe l'AcChE globulaire de l'homme pour des concentrations environ 10 000 fois inférieures à celles nécessaires pour inactiver la ChE plasmatique dans les mêmes proportions. — En outre, et contrairement au Nu-1250, le 3318 CT est aussi un antiacétylcholinestérasique sélectif dans le cas des enzymes du chien, le rapport activité anti-AcChE : activité anti-ChE étant ici de 10 000 à 100 000; cette activité antiacétylcholinestérasique est très élevée, environ 10 fois supérieure à celle du Nu-1250 sur l'AcChE globulaire humaine et de 10 à 100 fois supérieure à celle de la Prostigmine sur l'AcChE globulaire du chien. Comme la prostigmine et comme le Nu-1250, le 3318 CT est un inhibiteur réversible car l'inhibition observée rétrocede lorsque le complexe enzyme-substrat est dilué.

b) *Essais in vivo*. L'existence d'un effet de dilution nous a conduit à réaliser la majorité de nos déterminations (Tableau II) avec du sang (ou du plasma) aussi peu dilué que possible et avec des substrats dits spécifiques, c'est-à-dire avec de la benzoylcholine (0,01 M) pour les activités des XChE, et de l'acétyl- β -méthylcholine (0,03 M) pour celles des AcChE. En plus des corrections classiques, ceci a nécessité la détermination des coefficients de rétention du sang (ou du plasma)⁴. Le sang était systématiquement prélevé avant et une demi-heure après l'injection de 3318 CT. Dans ces conditions, aucune inhibition significative des XChE sanguines ne fut observée, même après 1 mg/kg i.v., alors qu'une inactivation nette des AcChE apparut dès après 0,01 mg/kg. Des déterminations réalisées dans d'autres conditions, avec l'acétylcholine comme substrat, ont confirmé, dans les limites des erreurs qu'elles impliquent, le caractère sélectif de l'inhibition des AcChE par le 3318 CT.

¹ A. FUNKE et K. VON DÄNIKEN, Bull. Soc. Chim. France, 457 (1953).

² A. FUNKE, J. JACOB et K. VON DÄNIKEN, C. r. Acad. Sci. 236, 149 (1953).

³ R. AMMON, Pflügers Arch. 38, 729 (1934).

⁴ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS et J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques* (Burgess Publ. Co., Minneapolis 1945), p. 115.

Tableau I
Inhibitions, *in vitro* (en %), de cholinestérases sanguines par le 3318 CT

Source d'enzyme			Concentration du substrat (AcCh)	Concentrations de 3318 CT (M)					
				10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Homme	Plasma	(1/30) . . .	0,06 M	82	45	10	5	5	7
	Globules	(1/60) . . .	0,005 M	—	—	—	97	80	56
Chien	Plasma	(1/30) . . .	0,06 M	43	9	3	—	0	0
	Globules	(1/24) . . .	0,005 M	—	95	94	84	60	34