

tions of these drugs resulting in partial growth inhibition affected the uptake of phosphorus by the mycobacterial cell. We worked with a saprophytic strain "S" as the sensitive test-organism of our experiments, using the specific effect described earlier of these compounds on the genus mycobacterium¹. Using the radioisotope ³²P as the indicator of phosphorus-quantity bound by the cells, we found an increased uptake of ³²P after the application of partial growth-inhibiting concentrations of INH and PAS, or else its accumulation in the mycobacterial cell. The following graphs show the relation between the growth-inhibition induced with INH or PAS and the uptake of ³²P in the mycobacterium "S".

From the graphs it is obvious that the increased ³²P uptake is strongly dependent on the rate of growth-inhibition. Because a similar increase of ³²P uptake or accumulation was also registered when using penicillin (300 i.u.) for 1 h on a strain of *Staphylococcus aureus* (a 24-h-old culture growth on broth in our experiments), a wellknown fact explainable by an enormous increase of nucleic acid as the result of penicillin action², we suppose that this fact, when induced with compounds of different structural composition, may be considered more generally than was the case until now. On the other hand, some Japanese authors observed that oxytetracycline exerts an inhibiting action on the incorporation of ³²P by *Staphylococcus aureus* strains³.

There are some theoretical possibilities to explain the above-mentioned observed fact. One of them, based firstly on its unspecificity and secondly on some new investigations dealing with the problem of the high-energy phosphorus bounds⁴ may be described as follows:

- (1) The antituberculotica used do not destroy the synthesis of the high-energy phosphorus compounds (the oxidative phosphorylation);
- (2) nevertheless the resolution of the energy of these compounds is decreased and thus accumulation of them occurs in the cells⁵.

Further experiments are needed to show whether this hypothesis is right.

M. POLSTER

Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Brno, Czechoslovakia, August 15, 1955.

Zusammenfassung

Beim Studium des Wirkungsmechanismus der synthetischen Tuberkulostatika INH und PAS wurde festgestellt, dass die inhibierenden Konzentrationen dieser Substanzen eine Steigerung des Verbrauches (evtl. Anhäufung) des Radiophosphors ³²P in Zellen der Mykobakterien verursachen. Diese Steigerung des ³²P-Verbrauches steht proportionell zur Inhibitionsstufe.

¹ A. LEMBKE, E. KRÜGER-THIEMER, R. B. KUHN, and W. UECKER, Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 16, 222 (1953).

² L. ETTLINGER, Schweiz. med. Wschr. 85, 271 (1955).

³ Y. MIURA, Y. NAKAMURA, Y. YOSHIKAWA, and H. MATSUDAIRA, Antibiot. and Chemother. 3, 822 (1953).

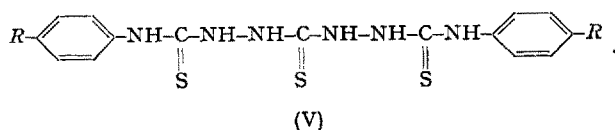
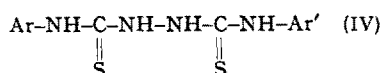
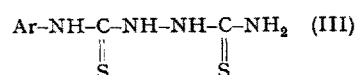
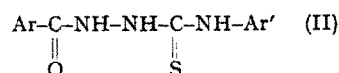
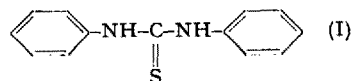
⁴ H. A. KREBS, Brit. med. Bull. 9, 97 (1953). – A. KLEINZELLER, Chemické listy 49, 376 (1955).

⁵ M. MACHEBEUF, Bull. Soc. chim. France 30, 161 (1948).

Activité *in vivo* de dérivés de la thiourée contre le virus de l'influenza¹

Les recherches sur les composés chimiques possédant une activité antivirale, en particulier en ce qui concerne le virus de l'influenza, ont surtout porté jusqu'à présent sur les antimétabolites, tels que les antagonistes d'acides aminés ou de bases puriques indispensables². D'autre part, les tests généralement utilisés, et qui étaient basés sur l'inhibition du développement du virus en cultures de tissus ou sur embryon de poulet, ne donnaient que peu d'indications sur la portée pratique de cette inhibition, et un grand nombre de substances ainsi reconnues comme actives se sont révélées inefficaces contre l'infection chez l'animal³.

Récemment, en recourant directement à un test chimiothérapeutique chez la souris, nous avons pu déceler une activité contre le virus de l'influenza chez plusieurs dérivés de la thiourée, en particulier chez le 4-chloro-4'-fluorothiocarbanilide⁴. Depuis, nous avons étendu cette étude à de nombreux composés analogues, afin de rechercher des relations entre constitution chimique et activité antivirale dans ce domaine. Les nouvelles substances ainsi examinées sont (à trois exceptions près) des molécules renfermant un ou deux groupements NH-CS-NH-. Ce sont principalement: 1° des dérivés substitués du thiocarbanilide (I); 2° des 1-acyl-4-arylthiosemicarbazides de formule générale (II); 3° des 1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides (III); 4° des 4-aryl-1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides (IV); et 5° des bis-anilides (V) de l'acide thio-carbohydrazide-bis-1, 5-thiocarbonique.



Les composés (I), (II), (III), (IV) et (V) ont été préparés en faisant réagir des isothiocyanates d'aryles respectivement sur des arylamines⁵, des hydrazides⁶, la thio-

¹ Communication présentée au Congrès international de Chimie pure et appliquée de Zürich (Juillet 1955).

² Cf. I. TAMM, K. FOLKERS et F. L. HORSFALL jr., Yale J. Biol. Med. 24, 559 (1952); J. exper. Med. 98, 219 (1953). – I. TAMM, K. FOLKERS, F. L. HORSFALL jr. et C. H. SHUNK, J. exper. Med. 99, 227 (1954). – C. HANNOUN, C. r. Acad. Sci. 236, 864 (1953).

³ Cf. K. K. TAKEMOTO, M. L. ROBBINS et P. K. SMITH, J. Immunol. 72, 141 (1954).

⁴ N. P. BUU-HOI, P. GLEY, N. D. XUONG et A. BOUFFANAIS, C. r. Acad. Sci. 238, 2582 (1954).

⁵ Cf. N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG et N. H. NAM, J. chem. Soc. 1955, 1573.

⁶ N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG et N. H. NAM, C. r. Acad. Sci. 238, 295 (1954).

Tableau I. Injection sous-cutanée

Thiocarbanilides	Dose totale par 20 g de poids d'animal mg	Survies au 13 ^e jour	Dose létale par kg de poids d'animal (toxi- cité aigüe) en g
4-Chloro-4'-fluoro-	10	6	0,75
2,5-Dichloro-	24	0	> 3,5
2,5,4'-Trichloro-	12	1	1,5
2,5-Dichloro-4'-fluoro-	8	4	1,25
2-Méthoxy-5-méthyl-	24	1	> 3,0
2,2'-Diméthoxy-5,5'-diméthyl-	24	2	> 3,0
4-Fluoro-2'-méthoxy-5'-méthyl-	12	2	1,5
4-Chloro-4'-fluoro-2-méthoxy-	12	1	1,5
4-Chloro-2'-méthoxy-5'-méthyl-	12	0	1,5
4-Bromo-2'-méthoxy-5'-méthyl-	24	0	> 1,5
Thiosemicarbazides			
4-Fluorophényl-	0,2	2	0,025
1-(Phénylaminothioformyl)-	0,4	0	0,05
1-(α -Naphthylaminothioformyl)-	0,2	2	0,025
1-(β -Naphthylaminothioformyl)-	3	1	0,3
1-(2-Xénylaminothioformyl)-	3	0	0,19
1-(<i>p</i> -Fluorophénylaminothioformyl)-	4	4	0,5
1-(<i>p</i> -Chlorophénylaminothioformyl)-	6	0	0,75
1-(<i>p</i> -Bromophénylaminothioformyl)-	20	1	3,0
1-(<i>p</i> -Isoamylxyphénylaminothioformyl)-	28	0	> 3,0
4-Phényl-1-(phénylaminothioformyl)-	16	1	3,0
4-Phényl-1-(<i>p</i> -tolylaminothioformyl)-	20	0	1,5
4- <i>p</i> -Méthoxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	24	0	3,0
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	20	1	3,0
4- <i>p</i> -Chlorophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	30	4	> 3
4- <i>p</i> -Bromophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	20	4	3,0
4- <i>p</i> -Éthoxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	30	6	> 3
4- <i>p</i> -Isoamylxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	40	0	> 3
4-(2,4-Xylyl)-1-(phénylaminothioformyl)-	40	1	> 3
4- β -Naphthyl-1-(phénylaminothioformyl)-	40	0	> 3
4- α -Naphthyl-1-(phénylaminothioformyl)-	16	0	1,9
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-(<i>p</i> -fluorophénylaminothioformyl)-	24	3	> 3
4- <i>p</i> -Chlorophényl-1-(<i>p</i> -fluorophénylaminothioformyl)-	24	0	> 3
4- <i>p</i> -Bromophényl-1-(<i>p</i> -bromophénylaminothioformyl)-	24	2	> 3
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-(<i>p</i> -tolylaminothioformyl)-	24	1	> 3
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-(<i>m</i> -tolylaminothioformyl)-	24	0	> 3
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-(<i>p</i> -méthoxyphénylaminothioformyl)-	24	1	> 3
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-(<i>p</i> -éthoxyphénylaminothioformyl)-	24	2	> 3
4- <i>p</i> -Chlorophényl-1-isonicotinoyl-	8	0	1,25
4- <i>p</i> -Fluorophényl-1-isonicotinoyl-	8	1	1
4- <i>p</i> -Méthoxyphényl-1-isonicotinoyl-	6	0	0,75
4- <i>p</i> -Éthoxyphényl-1-isonicotinoyl-	16	5	1,5
4- <i>p</i> -Éthoxyphényl-1-salicoyl-	24	2	3
4- <i>p</i> -Éthoxyphényl-1-(5-chlorosalicoyl)-	24	1	3
4- <i>p</i> -Méthoxyphényl-1-(3,5-dichlorosalicoyl)-	20	4	3
4- <i>p</i> -Méthoxyphényl-1-(5-bromosalicoyl)-	24	0	> 2,5
Composés divers			
Di- <i>p</i> -fluoroanilide de l'acide thiocarbohydrazido- <i>bis</i> -1,5-thiocarbonique	20	0	> 1,5
Di- <i>p</i> -chloroanilide de l'acide thiocarbohydrazido- <i>bis</i> -1,5-thiocarbonique	24	1	> 2,25
Di- <i>p</i> -phénétide de l'acide thiocarbohydrazido- <i>bis</i> -1,5-thiocarbonique	24	1	> 2,25
4-Chloro-4'-fluorocarbanilide	24	1	> 1,5
Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	20	4	> 3
Acide kojique	20	2	> 1,5

semicarbazide, des 4-arylthiosemicarbazides, et le thiocarbohydrazide⁷.

La technique expérimentale employée consiste à utiliser des souris de poids moyen de 20 g, auxquelles on administre par voie intranasale et sous anesthésie, une dose de virus de l'influenza de type A, souche PR 8 cul-

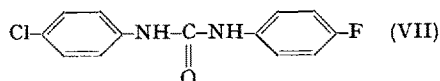
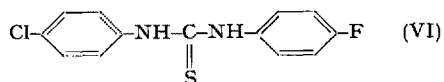
tivée sur œufs embryonnés de poulet, suffisante pour produire 100% de mortalité chez les témoins avant le 13^{ème} jour. La substance à examiner est administrée en 4 injections sous-cutanées: 1 le jour de l'infection, et les 3 autres 1 tous les 2 jours; quelques substances ont également été administrées par voie orale. Pour chaque substance, une série de 10 animaux traités et une série de 10 animaux témoins ont été utilisées, et pour plusieurs de ces substances, les séries ont été recommencées.

⁷ N. P. Bui-Hoi, T. B. Loc et N. D. Xuong, Bull. Soc. chim. 22, 694 (1955).

Tableau II. Administration orale

Thiocarbanilides	Dose journalière par 20 g de poids d'animal mg	Survies au 13 ^e jour	Dose tolérée par kg et par jour g
4-Chloro-4'-fluoro-	7	2	0,375
4-Chloro-4'-fluoro-	7	1	0,375
2,5-Dichloro-4'-fluoro-	9	1	1,125
Thiosemicarbazides			
1-(<i>p</i> -Fluorophénylaminothioformyl)-	4,5	2	0,225
4- <i>p</i> -Chlorophényl-1-(phénylaminothioformyl)-	20	0	1,0
4- <i>p</i> -Ethoxyphényl-1-(phénylaminothioformyl)-	22	1	1,125
4- <i>p</i> -Méthoxyphényl-1-(3,5-dichlorosalicyl)-	15	0	0,75
4- <i>p</i> -Ethoxyphényl-1-isonicotinoyl-	6	0	0,30

Les résultats obtenus avec une cinquantaine de substances, et qui sont résumés dans les 2 Tableaux ci-dessus, confirment l'activité antivirale dans le groupe des dérivés de la thiourée, en particulier des composés fluorés et chlorés. Cette activité, notable lorsque le produit est administré par injection, est beaucoup moins importante par voie buccale. L'influence favorable du groupement $\text{C}=\text{S}$ est manifeste, comme il ressort de la chute d'activité observée lorsqu'on passe du 4-chloro-4'-fluorothiocarbanilide (VI) à son analogue oxygéné, le 4-chloro-4'-fluorocarbanilide (VII).



Il est toutefois à noter que deux composés non soufrés, l'acide β -résorcylique et l'acide kojique, montrent une certaine activité. Il est également à remarquer que le 4-chloro-4'-fluorothiocarbanilide possède une faible activité retardatrice sur l'évolution de la polyomyélite expérimentale chez la souris, produite par le virus Lansing (expérience pour laquelle nous remercions M. le Professeur LÉPINE de l'Institut Pasteur de Paris).

N. P. BUU-HOÏ, A. BOUFFANAIS,
P. GLEY, N. D. XUONG et N. H. NAM

Département de Chimie organique de l'Institut du Radium, Université de Paris, et Laboratoires de Recherches de la Firme Roussel, I.S.H., Paris, le 1^{er} novembre 1955.

Summary

A large number of sulphur-containing compounds bearing the thiourea group $-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}-$, including substituted thiocarbanilides, 1-acyl-4-arylthiosemicarbazides, 1-(arylaminothioformyl)-thiosemicarbazides, and other related substances have been tested for potential antiviral activity. Several of these compounds have been found chemotherapeutically active against influenza virus.

Pitch Discrimination in the Minnow (*Phoxinus laevis*) at Different Temperature Levels

Training experiments have shown that the minnow is able to perceive tones within the range from about 20 to 5000 c/s by using its labyrinth (sacculus and lagena)¹. Two tones of different frequency are distinguished². The threshold of pitch discrimination at the level of 400 or 800 c/s is about a quarter of a tone (3% frequency difference). Above 1260 c/s, however, there is no pitch discrimination at all³.

The two main theories explaining pitch discrimination are the place theory⁴ and the telephone theory⁵. The place theory seems hardly applicable to the minnow, because any structure suited to serve as a pre-nervous frequency analyser (like the basilar membrane in higher vertebrates) is apparently lacking. The second theory, on the other hand, as modified by WEVER in his volley theory⁶, might be applicable⁷. As has been pointed out earlier, a rise in temperature will shorten the refractory period of nerve fibres and therefore increase certain sensory abilities in cold-blooded animals⁸. Similarly, if pitch discrimination in the minnow is really based on the volley principle, a rise in temperature of the animal would effect a rise in its upper limit of pitch discrimination. The following experiments were undertaken in order to test this point⁹.

Training method.—According to the method of DIJKGRAAF and VERHEIJEN (1950), whose experiments were made at $\pm 20^\circ\text{C}$, blinded minnows were trained to react to a frequency difference of a major third (about 24%) in the range of 400–500 c/s, at room temperature (16°C). By using increasing frequencies, the limit of pitch discrimination was determined. After that the temperature was raised to 25°C and again the limit of pitch discrimination was determined.

¹ K. V. FRISCH and H. STETTER, Z. vgl. Physiol. 17, 686 (1932).

² Th. A. WOHLFAHRT, Z. vgl. Physiol. 26, 570 (1939).

³ S. DIJKGRAAF and F. J. VERHEIJEN, Z. vgl. Physiol. 32, 248 (1950).

⁴ H. L. F. v. HELMHOLTZ, 1857 [quoted by E. G. WEVER: *The theory of hearing* (John Wiley and Sons, Inc. New York; Chapman and Hall, Ltd., London, 1949), p. 25].

⁵ W. RUTHERFORD, 1886 [quoted by E. G. WEVER (1949), p. 77].

⁶ E. G. WEVER, 1949.

⁷ O. LÖWENSTEIN and T. D. M. ROBERTS, J. Physiol. 114, 471 (1951).

⁸ E. D. ADRIAN, K. J. W. CRAIG, and R. S. STURDY, Proc. roy. Soc. [B] 125, 435 (1938).

⁹ Preliminary results were obtained by W. VAN DER LEE in this laboratory (unpublished records).