

## Effets d'analogues du chloramphénicol sur la différenciation de l'œuf de l'oursin

### *Paracentrotus lividus*

Le chloramphénicol favorise la différenciation des structures entomésodermiques (végétalisation) chez l'oursin<sup>1-3</sup>. Le chloramphénicol augmente les effets végétalisants des ions lithium et contrebalance les effets animalisants des ions zinc et du bleu d'Evans. Le chloramphénicol est un inhibiteur des synthèses protéiques<sup>4</sup>; à concentration élevée il découple les phosphorylations des oxydations<sup>5</sup>.

L'activité du chloramphénicol est étroitement liée à la structure de sa molécule et des modifications de celle-ci, notamment celles qui portent sur sa chaîne latérale, entraînent la perte de son activité bactériostatique et de ses effets inhibiteurs sur les synthèses protéiques<sup>6-8</sup>. Par contre le groupe nitro fixé au noyau benzénique peut être remplacé par d'autres groupes sans qu'il en résulte nécessairement une perte d'activité<sup>9,10</sup>.

Afin d'établir les relations existantes entre la structure du chloramphénicol et son activité végétalisante nous avons comparé les effets, sur la différenciation de l'œuf d'oursin, du thiophénicol et de deux isomères du chloramphénicol. Les deux isomères, D- et L-thréo-chloramphénicol diffèrent par la configuration stérique de leur chaîne latérale. Le thiophénicol diffère du chloramphénicol par le remplacement du groupe nitro par un groupe méthylsulfonyl.

Les expériences sont faites sur les œufs de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Les œufs sont mis, 30 min après la fécondation, dans les solutions de chloramphénicol et de thiophénicol; après 22 h de traitement ils sont lavés et reportés dans l'eau de mer normale. Toutes les cultures sont faites à la température du laboratoire; chaque cristallisateur contient un nombre d'œufs de l'ordre de 1000 par ml.

Les isomères du chloramphénicol et le thiophénicol sont dissous directement dans l'eau de mer ainsi que le nitrobenzène utilisé dans ces expériences aux fins de comparaison, cet agent possède en effet un groupe nitro fixé au noyau benzénique.

Le D-thréo-chloramphénicol (1 à 0,7 mg/ml) provoque la végétalisation des larves. Les concentrations supérieures à 1 mg arrêtent le développement au cours de la segmentation. Avec les concentrations inférieures à 0,7 mg/ml, le développement se poursuit jusqu'aux stades gastrula (0,50 mg/ml), prismatique (0,30 mg/ml), pluteus (0,10 mg/ml). Le report dans l'eau de mer des larves traitées à ces basses concentrations améliore leur développement qui se poursuit jusqu'au stade pluteus.

Le L-thréo-chloramphénicol (1 à 0,40 mg/ml) arrête le développement au cours de la segmentation. Avec 0,30 mg/ml, quelques œufs seulement atteignent le stade blastula. Avec 0,20 mg/ml ce stade est atteint par tous les œufs, certains ébauchant la gastrulation; le report dans l'eau de mer améliore leur développement qui se poursuit jusqu'aux stades prismatique et pluteus.

Le nitrobenzène (0,25 à 0,15 mg/ml) arrête le développement pendant la segmentation. Avec 0,10 mg/ml le stade blastula est atteint; après leur report dans l'eau de mer, ces blastulas se développent en larves prismatiques et petits pluteus. Certaines de ces larves présentent une évagination de l'archentéron; il s'agit d'une exovagination simple sans signe de végétalisation, le volume des structures entomésodermiques n'étant pas augmenté. Avec 0,05 mg/ml les pluteus se développent, mais leur taille est inférieure à celle des témoins; avec 0,02 mg/ml les pluteus sont comparables aux témoins.

*Thiophénicol.* La solubilité du thiophénicol ne permet pas de dépasser la concentration de 3 mg/ml. A cette concentration, le développement des larves, légèrement ralenti, se poursuit jusqu'au stade prismatique. Des pluteus, plus petits que les témoins, sont obtenus avec 2 mg/ml. Avec 1 mg/ml les pluteus sont comparables aux témoins.

*Discussion.* Le chloramphénicol se comportant comme un inhibiteur des synthèses protéiques et, à concentration élevée, comme un agent découplant les phosphorylations des oxydations, dans quelle mesure ces propriétés interviennent-elles dans le déterminisme de la végétalisation?

Chez l'œuf d'oursin entier fécondé, le chloramphénicol utilisé à une concentration élevée, supérieure à celle nécessaire pour provoquer la végétalisation, inhibe l'incorporation de la valine marquée dans les protéines et empêche la formation des polyribosomes<sup>11</sup>. Ces effets s'observent également avec le dinitrophénol, un agent qui découple les phosphorylations des oxydations et le cyanure, un inhibiteur des oxydations cellulaires. Le dinitrophénol et le cyanure, dans des conditions déterminées, se comportent comme des agents végétalisants<sup>12,13</sup>. Les modalités de l'effet végétalisant du dinitrophénol diffèrent toutefois de celles du chloramphénicol; le dinitrophénol contrairement au chloramphénicol ne provoquant que très rarement la végétalisation des œufs entiers. Avant qu'une conclusion puisse être tirée quant au rôle éventuel du découplage des phosphorylations oxydatives dans le déterminisme de la végétalisation, il est nécessaire de comparer les effets de différents agents découplant sur la morphogénèse et d'examiner l'influence des isomères du chloramphénicol et du thiophénicol sur les phosphorylations oxydatives. Il est en effet possible que le découplage des phosphorylations oxydatives soit responsable de l'inhibition non spécifique du développement telle qu'elle s'observe avec le L-thréo-chloramphénicol et le nitrobenzène. Cette propriété pourrait être liée à la présence du groupe nitro sur le noyau benzénique.

Le D-thréo-chloramphénicol inhibe les synthèses protéiques chez les microorganismes. Les cellules des métazoaires apparaissent relativement insensibles à son action inhibitrice<sup>14</sup>, cependant une incubation prolongée en présence de chloramphénicol a permis d'obtenir une inhibition de la synthèse des anticorps<sup>15,16</sup>. Des hypothèses récentes<sup>17-19</sup> suggèrent que le chloramphénicol, en se

<sup>1</sup> R. LALLIER, *Experientia* 18, 141 (1962).

<sup>2</sup> R. LALLIER, *J. Embryol. exp. Morphol.* 10, 563 (1962).

<sup>3</sup> S. HÖRSTADIUS, *Devl. Biol.* 7, 144 (1963).

<sup>4</sup> E. F. GALE et T. F. PAINE, *Biochem. J.* 48, 298 (1951).

<sup>5</sup> C. D. STONER, T. K. HODGES et J. B. HANSON, *Nature* 203, 258 (1964).

<sup>6</sup> J. N. ASHLEY et M. DAVIS, *J. chem. Soc.* 7, 63 (1952).

<sup>7</sup> D. S. MORRIS et S. D. SMITH, *J. chem. Soc.* 2, 1680 (1954).

<sup>8</sup> YEE-SHENG KAO et PEI-CHUAN PAN, *Scientia sin.* 12, 869 (1963).

<sup>9</sup> O. DANN, H. ULRICH et E. F. MÖLLER, *Z. Naturforsch.* 5, 446 (1950).

<sup>10</sup> R. A. CUTLER, R. J. STENGER et C. M. SUTER, *J. Am. chem. Soc.* 74, 5475 (1952).

<sup>11</sup> T. HULTIN, *Expl. Cell Res.* 34, 608 (1964).

<sup>12</sup> S. HÖRSTADIUS, *J. Embryol. exp. Morphol.* 1, 327 (1953).

<sup>13</sup> G. CZIHAK, *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* 154, 272 (1963).

<sup>14</sup> H. BORSOOK, E. H. FISHER et G. KEIGHLEY, *J. biol. Chem.* 229, 1059 (1957).

<sup>15</sup> C. T. AMBROSE et A. H. COONS, *J. exp. Med.* 117, 1075 (1963).

<sup>16</sup> A. S. WEISBERGER, T. DANIEL et A. HOFFMAN, *J. exp. Med.* 120, 183 (1964).

<sup>17</sup> R. RENDI et S. OCHOA, *J. biol. Chem.* 237, 3711 (1962).

<sup>18</sup> D. VAZQUEZ, *Nature* 203, 257 (1964).

<sup>19</sup> A. S. WEISBERGER et S. WOLFE, *Fedn. Proc. Am. Socs. exp. Biol.* 23, 976 (1964).

fixant a ruxibosomes, interfère avec la fixation de l'ARN messager sur les ribosomes empêchant ainsi la synthèse des protéines. Cette activité inhibitrice est liée à la structure du chloramphénicol. C'est ainsi que le dérivé L-thréo du chloramphénicol n'inhibe pas la synthèse des protéines<sup>17</sup> alors que le thiophénicol a conservé cette aptitude<sup>19,20</sup>. Ces deux agents sont toutefois dépourvus d'effets végétalisants chez l'oursin. Il apparaît donc que la configuration D-thréo de la chaîne latérale et la présence du groupe nitro fixé sur le noyau benzénique sont nécessaires à l'activité végétalisante. Ces considérations nous conduisent à suggérer l'hypothèse suivante pour rendre compte de l'activité végétalisante du chloramphénicol: l'inhibition des synthèses protéiques serait nécessaire pour obtenir un effet végétalisant mais cette inhibition serait orientée par le groupe nitro responsable de la fixation de la molécule de chloramphénicol sur un site déterminé des ribosomes ou sur un type particulier de ribosomes. Les ribosomes dont le fonctionnement est ainsi inhibé par la fixation du chloramphénicol seraient responsables de la synthèse des protéines impliquées dans la différenciation des structures ectodermiques<sup>21</sup>.

*Summary.* The effects of L-threo-chloramphenicol and thiophenicol on the differentiation of sea-urchin eggs are

compared with those exerted by D-threo-chloramphenicol. Only D-threo-chloramphenicol caused vegetalization; L-threo-chloramphenicol inhibited development. These effects resemble those of nitrobenzene. Thiophenicol, differing from D-threo-chloramphenicol by replacing the nitro group with a methylsulphonyl group, slows down development at high concentrations. The effects of chloramphenicol on oxidative phosphorylation and synthesis of proteins are discussed. It is suggested that both the steric configuration type D-threo of the side chain and the presence of a nitro group are necessary for the vegetalizing activity.

R. LALLIER

*Station Zoologique, 06 Villefranche-sur-Mer (France),  
30 juin 1966.*

<sup>20</sup> A. S. WEISBERGER, S. WOLFE et S. ARMENTROUT, *J. exp. Med.* 120, 161 (1964).

<sup>21</sup> Remerciements. Je remercie le Dr. G. HAGEMANN des Services Scientifiques des Laboratoires Roussel-Uclaf pour un don de L-thréo-chloramphénicol et les Laboratoires Clin-Comar qui ont mis le Thiophénicol à ma disposition.

### Rate of Fall in Choline Acetyltransferase Activity in Denervated Diaphragms as Dependent on the Length of the Degenerating Nerve

The supersensitivity to chemical agents which develops in denervated skeletal muscle, has been found to appear earlier when the motor nerve is cut close to the muscle than when it is severed at some distance from it<sup>1,2</sup>. Thus in isolated strips of diaphragms of rats, a much higher supersensitivity to acetylcholine could be demonstrated 4 days after denervation when the phrenic nerve of the anaesthetized rat had been cut near its entrance into the muscle than when cut in the cranial part of the thorax<sup>2</sup>. Denervation supersensitivity in cells supplied with cholinergic nerves has been assumed to be due to the loss of some normal action of acetylcholine<sup>3,4</sup>, and it was therefore suggested that the normal acetylcholine release from the endings of the cut nerve might cease earlier the shorter the degenerating nerve stump<sup>2</sup>.

In the present experiments an attempt has been made to see whether the acetylcholine synthesizing capacity declines more rapidly when the peripheral stump of the transected nerve is short than when it is long. The diaphragm of the rat was chosen for these experiments since comparisons could be made with our previous observations on supersensitivity, and since choline acetyltransferase activity has been demonstrated in the rat diaphragm; section of the phrenic nerve was found by HEBB, KRNJELIĆ and SILVER<sup>5</sup> to cause a marked fall in the enzyme activity in this tissue.

Male rats weighing between 160 and 360 g were anaesthetized with pentobarbitone (60 mg/kg i.p.). To suppress bronchial secretion, atropine sulphate, 1 mg/kg, was in addition injected by the same route. Artificial respiration was given by a pump through a fine glass tube inserted into a small cut in the trachea. The right phrenic nerve

was divided between 2 ribs either just above the diaphragm or as high as possible within the thorax. After 24, 48 or 72 h the rats were killed with ether, and the diaphragms cut out, cleaned and divided into right and left hemidiaphragms. These were washed in Ringer solution, dried between gauze pads, and weighed. Acetone powder was then prepared from them and used for estimation of the choline acetyltransferase activity according to the method of HEBB (see NORDENFELT<sup>6</sup>). Acetylcholine formed on incubation was assayed in duplicate samples on the frog rectus preparation. The choline acetyltransferase activity was expressed as  $\mu$ g acetylcholine formed/h per hemidiaphragm. Usually 4 litter mates were used in each experiment; in 2 of them the phrenic nerve was cut proximally, in 2 distally. The 2 hemidiaphragms denervated in the same way were pooled and extracted with acetone together, and the activity of this sample was expressed as a percentage of that of 2 corresponding, normal, left hemidiaphragms. In some experiments, however, the acetone powder was made from one hemidiaphragm only, either because the other one was found not to be denervated or because 1 rat had died before the final experiment. Samples were prepared from altogether 40 rats: 12 one day, 16 two days and 12 three days after denervation. The length of the nerve stump in connection with the diaphragm after proximal denervation was found to vary

<sup>1</sup> J. V. LUCO and C. EYZAGUIRRE, *J. Neurophysiol.* 18, 65 (1955).

<sup>2</sup> N. EMMELIN and L. MALM, *Q. Jl. exp. Physiol.* 50, 142 (1965).

<sup>3</sup> H. H. DALE, *Proc. R. Soc. Med.* 28, 319 (1935).

<sup>4</sup> N. EMMELIN, *Experientia* 21, 57 (1965).

<sup>5</sup> C. O. HEBB, K. KRNJELIĆ, and A. SILVER, *J. Physiol.* 171, 504 (1964).

<sup>6</sup> I. NORDENFELT, *Q. Jl. exp. Physiol.* 48, 67 (1963).