

a function of the quantity of cells implanted. The implantation of guinea-pig cells to rats is not so effective as in the homologous animal. To obtain a blue lesion of 5–10 mm in rats implanted with orally immunized guinea-pigs gut cells, we need 10^8 nucleated cells whereas the same effect is obtained in homologous animal with approximately 10^6 cells. We did not succeed in obtaining a positive PCA with spleen cells from immunized animals, nor from gut or spleen cells from normal non-immunized guinea-pigs. In all our registered experiments, the PCA reaction was negative after 120 h.

Experiments to obtain a positive PCA when challenging with the following antigens: *Escherichia coli* 2380 RKTCC, *Sh. flexneri* 2a RKTCC and bovine serum albumin, were unsuccessful in all instances.

In a total of 20 animals immunized, 6 did not show positive reaction in gut nor in the spleen tissues.

Oral ingestion of antigens leading to stimulation of some immunological reaction is generally accepted with doubt. Therefore we looked for a technique that can evidence some reaction between the antigen and the orally immunized animal.

Gut cells of immunized animals showed positive PCA reactions when challenged with the homologous antigen and negative reaction when other antigens were used. This demonstrates that this reaction was highly specific. The specificity is probable also as related to the species of the animal, as in rats comparatively high cell quantities must be used to obtain positive results. It is also

interesting that 30% of the animals could not show a positive PCA reaction in the gut cells. This may be due to a phenotype individual ability to be stimulated by oral immunization. Further work to elucidate the nature of this reaction after oral immunization is in progress.

Zusammenfassung. Meerschweinchen wurden mit hitzeinaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien oral mit Sonde immunisiert. 16 Tage nach der Impfung wird diesen Tieren der Dünndarm entnommen, zerkleinert und im passiven, kutanen Anaphylaxie-Test (PCA) in unbehandelten Meerschweinchen und Ratten auf Antikörperbildung geprüft. Im Dünndarm von zwei Dritteln der oral geimpften Meerschweinchen wurden hochspezifische Reagine mit der PCA-Technik nachgewiesen.

Y. LEVANON⁹, H. RAETTIG
and S. M. O. ROSSETINI⁹

Robert-Koch-Institut im Bundesgesundheitsamt, Abt. f.
Bakteriologie und Seuchenforschung,
Berlin (Germany), 30 January 1968.

⁹ Invited for research plan by the Senator für Gesundheitswesen, Berlin. Permanent address: Instituto Adolfo Lutz, S. Paulo, Brazil.

Production d'anticorps 7 S et 19 S chez des Rats d'âge différent

Dans un travail publié antérieurement^{1,2} nous avons montré qu'après injection d'antigène protéique à 2 échantillons de rats Wistar d'âge différent, la production d'anticorps des animaux âgés était inférieure à celle des animaux jeunes.

Dans le présent travail, nous avons cherché à confirmer et à préciser nos premiers résultats en variant les échantillons et le mode d'immunisation, et en dosant les anticorps avant et après action du 2-mercaptoéthanol. On a montré en effet que les anticorps de poids moléculaire élevé (19 S) qui caractérisent la première phase de la réponse primaire sont sensibles à l'action du 2-mercaptoéthanol et que les anticorps de poids moléculaire plus faible (7 S) qui caractérisent la seconde phase, résistent à cet agent réducteur³⁻⁷.

Conditions expérimentales. Deux expériences furent entreprises indépendamment, la première portant sur la synthèse des anticorps 7 S et 19 S au début de l'immunisation (40 premiers jours), la seconde sur l'évolution des taux d'anticorps au cours d'une période plus prolongée (du 10e au 120e jour) et après injection de rappel (60e jour).

Dans ces 2 expériences, nous avons immunisé des rats Wistar (WCF) femelles, avec de la sérum albumine bovine (SAB) (Behring-Werke). Chaque animal recevait 1 mg de SAB émulsionné dans de l'Adjuvant de Freund complet (Difco); volume final: 1 ml. L'injection était effectuée dans le coussinet plantaire: 0,15 ml dans chaque patte antérieure, 0,35 ml dans chaque patte postérieure. Des prises de sang ont été pratiquées avant l'immunisation et à des temps variés après injection de l'antigène. Tous les sérums – conservés à l'état congelé – ont été étudiés avant

et après traitement par le 2-mercaptoéthanol (2-ME), à la concentration finale de 0,1 M, pendant 1 h à 37°C.

La teneur en anticorps a été déterminée par hémagglutination passive^{8,9}. Chaque titrage a été effectué en 4 exemplaires. La fraction sensible au 2-ME a été appelée «19 S» et la fraction résistante «7 S». Afin de réaliser les meilleures conditions de comparaison, nous avons toujours titré simultanément dans les 2 expériences une série de sérums d'animaux jeunes et une série de sérums d'animaux âgés correspondant à tous les temps étudiés.

Résultats. (A) Synthèse des anticorps 7 S et 19 S au début de l'immunisation.

Pour cette expérience, nous disposions d'un échantillon de 24 animaux jeunes (10 semaines) d'un poids moyen de 160 g et d'un échantillon de 24 animaux âgés de 16 mois, d'un poids moyen de 325 g. Chaque échantillon a été divisé en 3 lots de 8 animaux chacun, saignés respectivement les 3e et 20e jours, les 6e et 30e jours, les 10e et 40e jours après l'injection de l'antigène.

¹ Ph. GOULLET et H. KAUFMANN, *Experientia* 21, 46 (1965).

² Ph. GOULLET et H. KAUFMANN, *Gerontologia* 10, 76 (1965).

³ H. F. DEUTSCH et J. I. MORTON, *Science* 125, 600 (1957).

⁴ J. W. UHR et M. S. FINKELSTEIN, *J. exp. Med.* 117, 457 (1963).

⁵ Y. B. KIM, S. G. BRADLEY et D. W. WATSON, *J. Immun.* 93, 798 (1964).

⁶ J. W. UHR, *Science* 145, 457 (1964).

⁷ G. W. SANTOS et A. H. OWENS JR., *Nature* 209, 622 (1966).

⁸ S. V. BOYDEN, *J. exp. Med.* 93, 107 (1951).

⁹ A. B. STAVITSKY, *J. Immun.* 72, 360 (1954).

La figure 1A permet de comparer les taux moyens d'anticorps anti-SAB obtenus dans les 2 échantillons. La figure 2A permet de distinguer la fraction sensible (19 S) et la fraction résistante (7 S) à l'action du 2-ME.

L'examen de ces graphiques montre que: (1) Pendant les 30 premiers jours qui suivent l'injection de l'antigène, la teneur globale en anticorps (7 S + 19 S) est très voisine sinon identique dans les 2 échantillons; signalons toutefois l'apparition plus précoce d'anticorps de type 19 S chez certains animaux âgés. (2) Du 30e au 40e jour, le taux des anticorps 7 S continue à monter chez les animaux jeunes, mais reste stationnaire chez les animaux âgés. (3) Aux divers temps étudiés, les anticorps 19 S des animaux âgés paraissent se maintenir à un taux très légèrement supérieur à celui des animaux jeunes.

(B) Evolution des taux d'anticorps au cours d'une période prolongée et après injection de rappel.

Pour cette expérience, nous disposions d'un échantillon de 40 animaux de 5 mois d'un poids moyen de 225 g et d'un échantillon de 40 animaux de 22 mois d'un poids moyen de 350 g. Chaque échantillon a été réparti en 3 lots de 12 animaux, saignés respectivement les 10e, 40e, 70e et 100e jours, les 20e, 50e, 80e et 110e jours, les 30e, 60e, 90e et 120e jours après l'injection de l'antigène mélangé à l'adjuvant de Freund; restaient 4 animaux témoins. Le rappel effectué le 60e jour consistait en l'injection par voie s.c. de 1 mg de SAB dans 1 ml d'eau physiologique.

La Figure 1B permet de comparer les taux moyens d'anticorps anti-SAB obtenus dans les 2 échantillons. La

Figure 2B permet de distinguer la fraction sensible (19 S) et la fraction résistante (7 S) à l'action du 2-ME.

L'examen des graphiques montre que: (1) A partir du 20e jour qui suit l'injection de l'antigène, les anticorps des animaux âgés restent à un taux inférieur à celui des animaux jeunes. Cette différence plus marquée vers les 40e et 50e jours provient d'une diminution relative du taux des anticorps 7 S. (2) L'injection de rappel pratiquée le 60e jour après la première injection détermine une légère remontée des anticorps 7 S qui s'effectue parallèlement dans les 2 échantillons. (3) Le traitement par le 2-ME semblerait révéler la persistance de très faibles quantités d'anticorps 19 S dans les 2 échantillons.

Discussion. D'après les résultats rapportés, la diminution globale de la production d'anticorps observée chez les animaux âgés affecte essentiellement la fraction 7 S. La diminution globale apparaît d'ailleurs moins marquée dans la présente expérience que dans le travail publié antérieurement^{1,2}; ce fait semble en rapport avec l'emploi de la nouvelle technique d'immunisation.

Les conditions expérimentales utilisées n'ont permis d'observer que de très légères différences paraissant affecter la fraction 19 S. Les faibles écarts enregistrés lors de la première expérience comme la persistance prolongée de faibles quantités d'anticorps sensibles au 2-ME dans la seconde demandent à être vérifiés.

De nouvelles expériences comportant des contrôles après ultracentrifugation sont nécessaires pour préciser les différences éventuelles entre les 2 échantillons et pour

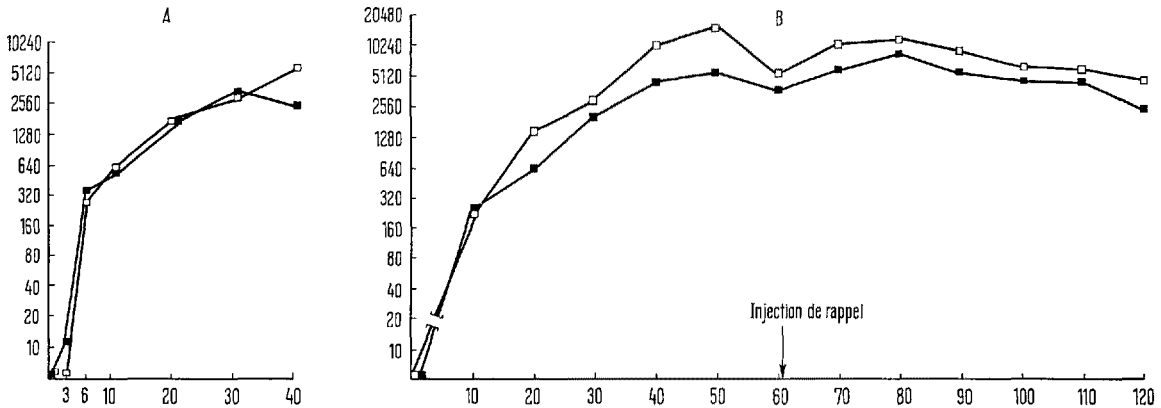


Fig. 1. Graphique représentant les moyennes des taux d'anticorps anti-SAB obtenus dans les 2 échantillons. En abscisse: nombre de jours depuis l'injection de l'antigène. En ordonnée: moyennes des taux d'hémagglutination. □ animaux jeunes, ■ animaux âgés.

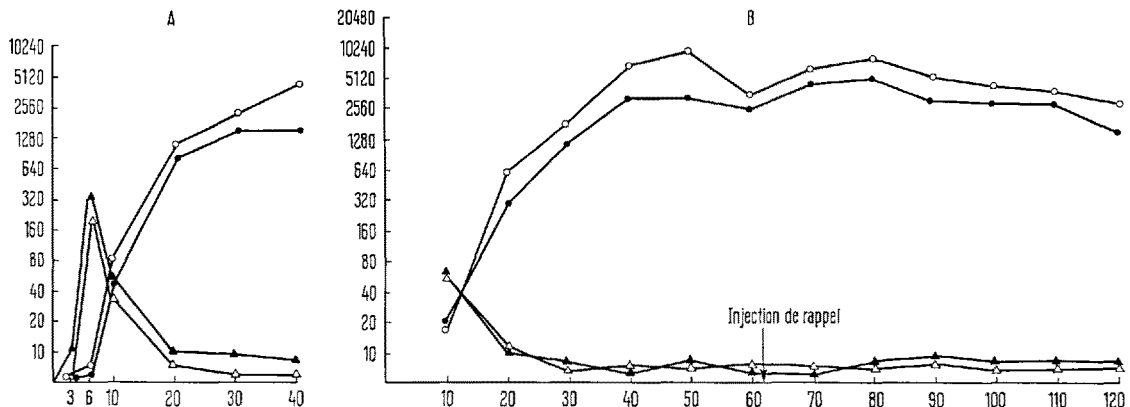


Fig. 2. Mêmes données que précédemment. Fraction sensible au 2-ME: △ animaux jeunes, ▲ animaux âgés. Fraction résistante au 2-ME: ○ animaux jeunes, ● animaux âgés.

affirmer que la sensibilité particulière de certaines molécules d'anticorps à l'agent réducteur correspond toujours à des anticorps 19 S.

Conclusion. Nos expériences montrent que dans les conditions utilisées la production d'anticorps des rats âgés est inférieure à celle des animaux jeunes et que cette différence provient d'une teneur plus faible en anticorps 7 S chez les animaux âgés. Elles permettent de constater toutefois que malgré cette diminution, les rats demeurent encore capables au cours de leur phase de senescence de produire des anticorps sériques à des taux relativement élevés.

Summary. Antibodies produced following injections of a proteinic antigen emulsified in Freund's adjuvant were studied by the passive hemagglutination test in some lots of WCF rats, varying in age. It is shown by treating sera

with mercaptoethanol that older animals produce less 7 S antibodies than younger ones, and that, despite this difference, rats remain able to elaborate seric antibodies at relatively high rates during their senescence period.

Ph. GOULLET¹⁰

avec la collaboration technique de
C. GAILLARD et de O. JEANNEQUIN

*Laboratoire de Recherches de la MGEN¹¹, Institut
Prophylactique, Paris VIe (France),
15 décembre 1967.*

¹⁰ Adresse: 72, boulevard Voltaire, Paris XI.

¹¹ Service du Docteur H. KAUFMANN.

The Inhibition of Antibody Production in Mice Caused by the Injection of Specific Antiserum on the First Day of Life

Relatively few papers¹⁻³ concerning the problem of inhibition of antibody production caused by prior passive immunization have been published. The mechanism of this phenomenon has not been explained yet.

The aim of our research was the examination of the influence of the antiserum dose used in the passive immunizing of neonatal mice and of the manner of antiserum injection on the inhibition degree of immunogenesis.

Material and methods. In general, 196 1-day-old white mice were used for the investigation. 35 mice were control animals, the other mice were given intracardially, i.p. or s.c. the different doses of diphtheria anti-toxin serum (25, 50, 100 anti-toxin units - A.U.).

When the animals were 3 weeks old they were immunized with diphtheria toxoid; the mice passively im-

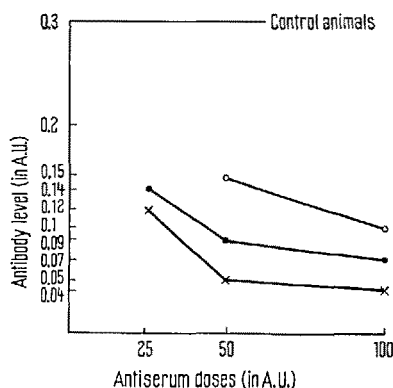
munized on the first day of life and the control mice were injected s.c. 3 times each week for 4 weeks with 2 Limes flocculatio (Lf) toxoid (weekly toxoid dose was 6 Lf and general dose of diphtheria toxoid used for the immunization of mice amounted to 24 Lf).

Six days after the end of the immunizing cycle, the mice were bled by intracardial puncture and the diphtheria anti-toxins in the sera were determined by JENSEN's method on guinea-pigs. It should be pointed out here that we found diphtheria anti-toxins passively introduced into the neonatal mice to be absent in sera of the

Diphtheria anti-toxin level in the sera of mice passively immunized on the first day of life and in the control sera

Passive immunization of neonatal mice	Dose of diphtheria anti-toxin serum used in passive immunization of neonatal mice, in A.U.					
	25		50		100	
	No. of mice	Average anti-toxin titre after active immunizing, in A.U.	No. of mice	Average anti-toxin titre after active immunizing, in A.U.	No. of mice	Average anti-toxin titre after active immunizing, in A.U.
Intra-cardial	10	0.12	34	0.05	19	0.04
i.p.	—	—	19	0.15	15	0.1
s.c.	16	0.14	22	0.09	26	0.07

In the control animals which were not given diphtheria anti-toxins on the first day of life the antibody titre in serum induced by active immunization amounted to an average of 0.3 A.U./ml.



Comparison of diphtheria anti-toxin level in the sera of mice passively immunized on the first day of life and in the control animal sera. ×—× intracardial injection of specific antiserum; ●—● s.c. injection of specific antiserum; ○—○ i.p. injection of specific antiserum.

¹ J. J. OSBORN, J. DANCIS and J. F. JULIA, *Pediatrics*, Springfield 10, 328 (1952).

² J. W. UHR and J. B. BAUMANN, *J. exp. Med.* 113, 935 (1961).

³ B. VAHLQUIST, U. MURRAY and N. G. PERSSON, *Acta paediat.*, Stockh. 35, 130 (1948).