

estimated from RNA turnover values is naturally only the mean between the 2 fractions. SINKS and HAYHOE observed greater RNA stability in actively proliferating phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes by comparison with non-proliferating chronic lymphocytic leukemia cells<sup>3</sup>. They consider that these differences simply reflect basal differences in RNA patterns during the various stages of the cell cycle. Our present finding of similar RNA breakdown rates in proliferating and non-proliferating cells in acute leukemia, however, indicates that loss of proliferative activity does not necessarily involve significant changes in RNA turnover.

STORTI and TORELLI, working with normal bone marrow erythroid and myeloid cells, found clear RNA instability in immature cells and greater stability in the advanced stages of both cell lines<sup>4-6</sup>. Similar turnover rates in both compartments in acute leukemia show that the transformation from large to small blast, with loss of proliferative activity and without differentiative evolution<sup>9-11,13</sup>, is not accompanied by the formation of the 'metabolically stable' RNAs typical of the more advanced stages of erythroid and myeloid maturation.

The following conclusions may be drawn: (1) there are no significant differences in RNA breakdown in pro-

liferating and non-proliferating blasts in acute leukemia; in each case, the half-life range is 1.5-3 h; (2) acute leukemia blast cells, even if in an advanced stage of evolution, are not capable of synthesizing the so-called 'stable' RNAs found in the more advanced stages of erythroid and myeloid maturation<sup>15</sup>.

**Riassunto.** In cellule di leucemia acuta umana incubate in vitro viene osservata una rapida degradazione dell'ARN sintetizzato prima del contatto actinomomicinico e vengono distinte 2 varietà di RNA a differente labilità metabolica. Uno stesso comportamento metabolico è stato osservato negli elementi blastici proliferanti e nonproliferanti.

A. PILERI, R. BERNARDELLI,  
L. BRUSA, P. G. DE FILIPPI  
and F. GAVOSTO

*Haematology Laboratory, General Medical Clinic of the University, 10126 Torino (Italy), 25 July 1968.*

<sup>15</sup> This work was supported by the Consiglio Nazionale delle Ricerche

## Mécanisme d'action du chloramphénicol dans l'inhibition de la production d'anticorps induite par de différents types d'antigènes

Le rôle fondamental des acides nucléiques dans la synthèse des anticorps est presque universellement admis<sup>1-6</sup> et cela est encore démontré par l'action de certaines substances (qui agissent sur le métabolisme des acides nucléiques) sur la synthèse des anticorps. Parmi les substances les plus connues à ce titre il y a quelques antibiotiques tels la puromycine, l'actinomycine D et le chloramphénicol: le mécanisme d'action des 2 premières substances est suffisamment connu<sup>7-9</sup>; il y a, en revanche, de nombreux points d'incertitude pour ce qui concerne l'action du chloramphénicol: en effet, AMBROSE et COONS pensent que le chloramphénicol inhibe la synthèse de l'ARN messager<sup>10,11</sup>, WEISBERGER et coll., en revanche, pensent que l'ARN responsable de l'élaboration du modèle des anticorps se forme malgré la présence du chloramphénicol, mais qu'il est inhibé dans sa fonction spécifique parce qu'il est empêché d'entrer en contact avec les nucléoprotéines des ribosomes qui contrôlent la synthèse protéique<sup>12-14</sup>. Dans le présent travail nous avons essayé de définir le mécanisme d'action du chloramphénicol et surtout de définir à quel stade de la synthèse des anticorps intervient l'inhibition.

On a employé des lapins sélectionnés du poids moyen de 2 kg maintenus à un régime normalisé. Les antigènes étaient: albumine et globulines bovines (SAB, SGB), globules rouges (GR) de rat et de cobaye (en suspension à 25%) et 2 souches de *Escherichia coli*, l'une sensible au chloramphénicol, l'autre résistante (détermination selon la méthode des disques) employées en suspension à 2%. Pour immuniser les lapins on faisait 4 injections d'antigène par voie i.v. ou s.c. à 7 jours l'une de l'autre. Les quantités injectées étaient, respectivement, de 10 mg pour SAB et SGB, de 2 ml pour GR et pour chacune des suspensions bactériennes. Dans chaque expérience, un lot d'animaux non traités par le chloramphénicol servait de témoin. L'administration de l'antibiotique commençait 24 h avant le début de l'immunisation et se poursuivait avec 2 injections journalières de 0,5 g, le produit

employé était du chloramphénicol succiné (CAF) fourni par l'Istituto Sieroterapico Milanese.

Les titres des anticorps étaient déterminés dans le sérum avant chaque injection et, à la fin du traitement, 4 jours après la dernière injection: ces déterminations étaient effectuées selon les techniques habituelles de l'agglutination pour les antigènes corpusculaires et selon celles de la précipitation zonale pour les antigènes solubles.

De chaque groupe d'animaux, à la fin de l'immunisation, on extrayait l'ARN du sérum selon une technique décrite dans un travail précédent<sup>6</sup>. Pour induire l'apparition d'anticorps actifs sur les mêmes antigènes avec lesquels avaient été immunisés les animaux des quels on avait extrait l'ARN, ce dernier était injecté soit à des

<sup>1</sup> R. W. DUTTON, A. H. DUTTON, M. GEORGE, R. R. MARSTON et J. H. VAUGHAN, *J. Immun.* 84, 268 (1960).

<sup>2</sup> E. P. COHEN, *Nature* 213, 462 (1967).

<sup>3</sup> M. FISHMAN et F. L. ADLER, *J. exp. Med.* 117, 595 (1963).

<sup>4</sup> L. MICHELAZZI, G. NANNI, I. BALDINI et A. NOVELLI, *Experientia* 20, 447 (1964).

<sup>5</sup> L. MICHELAZZI, A. NOVELLI, G. NANNI et I. BALDINI, *Experientia* 20, 703 (1964).

<sup>6</sup> L. MICHELAZZI, A. NOVELLI, I. BALDINI, U. M. MARINARI et G. NANNI, *Sperimentale* 115, 275 (1965).

<sup>7</sup> C. T. AMBROSE, *Bact. Rev.* 30, 408 (1966).

<sup>8</sup> I. H. GOLDBERG et E. REICH, *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 23, 958 (1964).

<sup>9</sup> A. B. STAVITSKY et J. P. GUSDON JR., *Bact. Rev.* 30, 418 (1966).

<sup>10</sup> C. T. AMBROSE et A. H. COONS, *J. exp. Med.* 117, 1075 (1963).

<sup>11</sup> W. T. BUTLER et A. H. COONS, *J. exp. Med.* 120, 1051 (1964).

<sup>12</sup> A. S. WEISBERGER, T. M. DANIEL et A. HOFFMAN, *J. exp. Med.* 120, 183 (1964).

<sup>13</sup> A. S. WEISBERGER, R. D. MOORE et M. D. SCHOENBERGER, *J. Lab. clin. Med.* 67, 58 (1966).

<sup>14</sup> T. M. DANIEL, L. G. SUHRLEND et A. S. WEISBERGER, *New Engl. J. Med.* 273, 367 (1965).

animaux normaux, soit à d'autres animaux préalablement traités avec CAF à la dose de 0,5 g/kg par jour; dans ce cas aussi le traitement avec le CAF commençait 24 h avant l'administration de l'ARN et il continuait pendant toute la durée de la période d'observation; la détermination des titres des anticorps était effectuée tous les jours à partir du premier jour après l'injection de l'ARN-immuno-inducteur<sup>4</sup> jusqu'au cinquième jour. L'ARN-immuno-inducteur était administré par voie i.v. à la dose unique de 1,50 mg/kg.

Le dosage de l'ARN et celui des protéines étaient exécutés en suivant les techniques de SCHMIDT et THANNHAUSER<sup>15</sup> et de FOLIN et CIOCALTEAU<sup>16</sup> respectivement.

Les animaux immunisés avec SAB et SGB ont fourni une réponse immunologique intense tandis que d'autres animaux immunisés de façon identique mais ayant reçu aussi le CAF suivant les modalités exposées ci-dessus ont donné des réponses immunologiques presque nulles. Le même phénomène a été observé avec les animaux traités par des antigènes bactériens: les lapins non soumis au traitement antibiotique et qui avaient été immunisés avec l'une ou l'autre des 2 souches, ont réagi fortement, tandis que les animaux immunisés de façon identique, mais soumis au traitement par le CAF, n'ont produit qu'une quantité d'anticorps presque nulle. Les animaux immunisés avec GR (de cobaye ou de rat) ont montré un comportement différent: le CAF ne modifie pas leur réponse immunitaire (Tableau I).

Des lapins immunisés simultanément avec 2 antigènes (SAB et GR de rat) ont produit des anticorps actifs sur chacun de ceux-ci, à des taux supérieurs à ceux qu'on peut obtenir en injectant les 2 substances séparément à des animaux différents; d'autres lapins immunisés de la même façon avec les mêmes antigènes et traités en même temps avec CAF n'ont pas montré d'appréciable changement de leur réaction aux antigènes GR tandis que leur réaction à l'antigène SAB était presque réduite à zéro (Tableau II).

Tableau I. Réponse immunologique à différents antigènes, de lapins normaux et de lapins traités avec chloramphénicol

Type d'antigène	Titres des anticorps aux suivants jours d'immunisation				No. des animaux
	7	14	21	25	
SAB	160	640	2560	5120	4
SAB + CAF	10	40	80	160	4
SGB	80	320	1280	2560	3
SGB + CAF	10	20	40	80	3
<i>E. coli</i>					
CAF sensible	160	320	640	2560	3
CAF sensible + CAF	10	20	80	160	3
<i>E. coli</i>					
CAF résistante	320	1280	2560	5120	2
CAF résistante + CAF	20	40	80	160	3
GR de rat	320	640	1280	2560	5
GR de rat + CAF	80	320	640	2560	5
GR de cobaye	160	320	640	1280	4
GR de cobaye + CAF	80	320	640	1280	4

SAB, sérum albumine bovine; CAF, chloramphénicol; SGB, sérum globuline bovine; GR, globules rouges. Les données exposées ont été arrondies au multiple de 10 le plus voisin à la moyenne réelle lorsqu'elles ne correspondaient pas à un multiple de 10.

Dans le Tableau III on a noté les valeurs obtenues en dosant l'ARN extrait du sérum des animaux immunisés avec 2 antigènes différents, bactéries CAF-sensibles et SGB respectivement, à la fin du cycle d'immunisation: on n'observe pas de différences significatives entre le contenu en ARN du sérum des animaux immunisés normalement (sérum riche en anticorps) et le contenu en ARN du sérum des animaux traités avec CAF pendant l'immunisation (sérum d'où les anticorps sont presque absents). Toutefois, tandis que l'ARN extrait du sérum des animaux immunisés sans être en même temps traités avec CAF, injecté par voie i.v. à des lapins normaux, produit rapidement des anticorps actifs sur les antigènes employés pour immuniser les animaux dont cet ARN avait été extrait, l'ARN extrait du sérum des animaux immunisés et en même temps traités avec CAF produit un effet immunisant sensiblement inférieur; d'ailleurs, des animaux traités par CAF à qui on injecte de l'ARN-immuno-inducteur extrait du sérum d'animaux immunisés mais non traités avec CAF, donnent une réponse immunitaire presque nulle, en tous cas sensiblement inférieure à celle des témoins non traités, et même à celle des animaux traités avec l'ARN-immuno-inducteur extrait du sérum d'animaux immunisés et en même temps soumis à traitement par CAF (Tableau IV). Puisque

Tableau II. Réponse immunitaire à 2 antigènes différents associés, injectés à des lapins normaux et à des lapins traités avec chloramphénicol

Type d'antigène		Titres des anticorps aux suivants jours d'immunisation				No. des animaux
		7	14	21	25	
GR de rat + SAB	anti GR	640	2560	5120	20480	5
	anti SAB	320	1280	5120	10240	
GR de rat + SAB + CAF	anti GR	640	2560	5120	10240	5
	anti SAB	20	20	40	80	

GR, globules rouges; SAB, sérum albumine bovine; CAF, chloramphénicol. Les données exposées ont été arrondies au multiple de 10 le plus voisin à la moyenne réelle lorsqu'elles ne correspondaient pas à un multiple de 10.

Tableau III. Dosage de l'ARN du sérum de lapins normaux ou traités avec chloramphénicol et immunisés par 2 antigènes différents

Type d'antigène	No. des expé- riences	mg ARN × 100 ml de sérum γ-globulines	autres fractions protéiques	Total
<i>E. coli</i>	2	4,37	4,75	9,12
<i>E. coli</i> + CAF	2	4,15	4,60	8,75
SGB	2	4,55	4,40	8,95
SGB + CAF	2	4,70	4,40	9,10

CAF, chloramphénicol; SGB, sérum globuline bovine.

<sup>15</sup> G. SCHMIDT et S. J. THANNHAUSER, J. biol. Chem. 167, 83 (1945).  
<sup>16</sup> O. FOLIN et V. CIOCALTEAU, J. biol. Chem. 73, 627 (1927).

Tableau IV. Effet immuno-inducteur obtenu au moyen de l'ARN-immuno-inducteur extrait de lapins immunisés et traités ou non avec chloramphénicol, injecté à d'autres lapins traités ou non avec chloramphénicol

Traitement des animaux qui donnent l'ARN-immuno-inducteur		Traitement des animaux qui reçoivent l'ARN-immuno-inducteur									
Type d'antigène	Traitement avec CAF	Non traités avec CAF (Titres des anticorps aux suivants jours après l'injection de l'ARN-immuno-inducteur)					Traités avec CAF				
		1	2 <sup>a</sup>	3	4	5	1	2 <sup>a</sup>	3	4	5
SGB	oui	20	40	20	10	neg. <sup>b</sup>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	non	80	160	80	20	neg.	neg.	10	neg.	neg.	neg.
<i>E. coli</i>	oui	20	40	20	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	non	80	320	160	80	20	10	10	neg.	neg.	neg.

CAF, chloramphénicol; SGB, sérum globuline bovine. <sup>a</sup> Jour où se vérifie le maximum de l'effet immuno-inducteur. <sup>b</sup> neg., titre inférieur à 1 : 10.

l'ARN-immuno-inducteur formé normalement (en l'absence de CAF) ne donne, chez les animaux traités par CAF, qu'une réponse immunologique presque nulle, il faut croire que, dans ce cas, l'inhibition de l'action de l'ARN se vérifie au niveau des cellules qui synthétisent les protéines anticorps. Pour ce qui concerne l'inhibition partielle de la production d'anticorps chez le lapin normal à qui l'on injecte l'ARN extrait du sérum de lapins immunisés et traités avec CAF, on doit penser à un second mécanisme d'action du CAF, moins important sous l'aspect quantitatif, mais complémentaire du précédent: c'est-à-dire la formation de complexes ARN-immuno-inducteur-CAF, partiellement non fonctionnels; ou bien, peut-être s'agit-il d'un phénomène plus simple, c'est-à-dire d'un transport passif de molécules de CAF liées à la molécule de ARN-immuno-inducteur, aux ribosomes des cellules lymphoïdes, avec inactivation partielle du site ribosomal utilisé par les ARN messenger et de transfert. On pourrait penser que le phénomène d'inactivation peut se produire en partie au niveau des molécules de l'ARN-immuno-inducteur et, de manière massive, au niveau des ribosomes vierges pour lesquels le CAF aurait une haute affinité ainsi que d'autres auteurs ont démontré<sup>17-20</sup>. Cela expliquerait aussi pour quelle raison, en extrayant de l'ARN de lapins immunisés pendant le traitement avec CAF et en l'injectant à des animaux eux aussi traités avec CAF, on obtient une inhibition complète de la réponse immunologique (Tableau IV): dans ce cas, en effet, au blocage exercé par le CAF sur les ribosomes, s'unirait l'action d'éventuels résidus de l'antibiotique transportés par les molécules d'ARN injecté ce dont résulterait une inhibition totale de la synthèse des anticorps.

Le comportement différent de la réponse immunologique produite par les GR (le CAF, en effet, ne la modifie pas) ne semble pas dû simplement au fait qu'il s'agit d'antigènes corpusculaires parce que d'analogues recherches effectuées avec des cellules bactériennes ont donné des résultats semblables à ceux qu'on avait obtenu avec des antigènes solubles. D'ailleurs la différence du comportement des GR, déjà relevée en des conditions expérimentales différentes<sup>21</sup>, a été confirmée aussi par le fait que les animaux immunisés en même temps avec GR et SAB et traités avec CAF ont donné un titre d'anticorps anti-albumine presque nul et un titre anti-GR à peine plus faible que celui des témoins. La raison de ce comportement différent nous échappe: peut-être l'insensibilité à l'action du CAF est elle le fait de certains clones cellulaires producteurs d'ARN-immuno-inducteur, ou celui des ribosomes impliqués dans la synthèse des protéines anticorps? Le phénomène pourrait aussi être dû

à la complexité de la structure des GR et à l'hétérogénéité des anticorps produits en réponse (certains de ces anticorps seulement étant sensibles à l'action inhibitrice du CAF). Le fait que les cellules bactériennes, elles aussi douées d'une structure complexe, n'aient pas eu le même comportement que les GR n'affaiblit pas cette dernière hypothèse, la structure des GR étant différente de celle des cellules bactériennes.

Nous pouvons conclure que, probablement, l'action inhibitrice du CAF ne s'exerce pas sur l'élaboration de l'ARN messenger, qui sert de modèle pour la synthèse des anticorps. Le blocage intervient en aval, sur la molécule de l'ARN ribosomal ou de transfert, ou dans la phase d'interaction ARN messenger-ARN de transfert-ribosomes pour la dernière partie de la synthèse de la chaîne polypeptidique des anticorps. Le comportement des GR, différent de celui des antigènes solubles et de celui des cellules bactériennes est probablement lié à la complexité particulière de la structure des GR, complexité qui se traduit par une diversité accrue des anticorps formés en réponse à l'injection de GR.

*Summary.* Chloramphenicol (CAF) administered to rabbits during the whole period of immunization, is able to suppress almost completely the antibody response against horse serum albumin and globulins (HSA, HSG) and *Escherichia coli*: on the other hand, it does not inhibit antibody response to heterologous RBC. The possible mechanism of the inhibiting action of the CAF in antibody response to HSA, HSG and *E. coli* is discussed, and some hypotheses are put forward on the possible reasons for the different behaviour of CAF on the immune response induced by heterologous RBC.

L. MICHELAZZI,  
U. M. MARINARI et I. BALDINI

*Institut de Pathologie générale de l'Université,  
16132 Genova (Italie), 4 juin 1968.*

<sup>17</sup> D. VAZQUEZ, in *Biochemical Studies of Antimicrobial Drugs* (Ed. B. A. NEWTON and P. E. REYNOLDS; 16th Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge Univ. Press, London, New York 1966).  
<sup>18</sup> A. D. WOLFE et F. E. HAHN, *Biochim. biophys. Acta* **95**, 146 (1965).  
<sup>19</sup> J. HOROWITZ et D. C. HILLS, *Biochim. biophys. Acta* **123**, 416 (1966).  
<sup>20</sup> C. COUTSOGEOGROPULOS, *Biochim. biophys. Acta* **129**, 214 (1966).  
<sup>21</sup> L. MICHELAZZI, I. BALDINI et U. M. MARINARI, *Experientia* **24**, 387 (1968).