

Antagonism of the activity of gentamicin by Liquoid

Medium	Fresh serum added (10%)	Liquoid added (0.05%)	Test organisms			
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
NB	—	—	0.12	0.12	0.25	2
	—	+	30	30	125	250
	+	—	0.12	0.12	1	4
	+	+	4	8	60	125
	—	—	2	2	1	4
	—	+	8	8	8	15
MHB	—	—	2	2	1	4
	—	+	8	8	8	15
	+	—	2	4	1	15
	+	+	8	8	15	30
	—	—	8	15	15	60
	—	+	15	15	30	125
TSB	—	—	8	8	8	60
	—	+	15	15	15	60
	+	—	15	15	15	60
	—	—	15	15	8	60
	—	+	60	60	30	125
	+	—	8	8	8	30
TGCB	—	—	30	30	30	60
	—	+	30	30	30	60
	+	—	30	30	30	60
	—	—	30	30	30	60
	—	+	30	30	30	60
	+	—	30	30	30	60

Furthermore, the MBC values bear this out much more clearly. Interestingly, the presence of 10% fresh serum tended to diminish the antagonistic effect of Liquoid somewhat, for example, in NB and TGCB.

Subsequent to these observations, we re-examined the effect of Liquoid versus kanamycin sulfate and polymyxin B, determining both the MIC and MBC of these

2 antibiotics versus strains of *Escherichia coli*. It was found that 10% fresh human serum did indeed enhance the antagonistic effect of Liquoid against polymyxin B, but not versus kanamycin sulfate. Therefore, we retract our earlier claims with respect to the enhanced antagonism of Liquoid against kanamycin sulfate in the presence of 10% fresh serum.

We should like to add that our attention has been drawn to a report⁴, indicating that Liquoid antagonized Polymyxin B in TSB, whereas this anticoagulant exerted no such effect versus kanamycin sulfate in the very same medium. However, as we have shown, the antagonism of aminoglycoside antibiotics by Liquoid appears to be a media-dependent phenomenon⁵.

Zusammenfassung. Liquoid® wirkt als Antagonist zu Gentamicin-Sulfat in Abhängigkeit vom jeweiligen Testnährmedium. Zugabe von frischem Serum bedingt im Gegensatz zu Polymyxin B keine Verstärkung seiner antagonistischen Wirkung gegen Aminoglykosid-Antibiotika.

W. H. TRAUB and B. L. LOWRANCE

Departments of Microbiology and Pathology,
Clinical Microbiology Laboratories,
The Bowman Gray School of Medicine,
Winston-Salem (North Carolina 27103, USA),
30 June 1969

⁴ E. YOURASSOWSKY, Acta clin. belg. Suppl. 4, 1 (1967).

⁵ Aided by a grant from the United Medical Research Foundation of North Carolina.

Diminution du nombre des mitoses à partir des précurseurs des cellules synthétisant les anticorps après immunisation de souris thymectomisées à la naissance¹

Les souris thymectomisées à la naissance ont une réponse humorale primaire diminuée vis à vis des globules rouges de mouton (GRM). Théoriquement, ce déficit peut être en rapport avec une sécrétion faible d'anticorps par chaque cellule, par un nombre faible de cellules précurseurs, par une réduction des mitoses aboutissant aux cellules élaborant les anticorps. Nous avons essayé en comparant les résultats fournis par l'immunocyto-adhérence, les plages d'hémolyse et les foyers d'hémolyse, d'apprécier ces différentes possibilités.

Matériel et technique. Nous avons utilisé des souris CF 1 de 1 mois 1/2 immunisées par une injection i.p. de 0,1 ml d'une suspension de GRM à 50%. 40 souris indemnes nous ont servi de témoins et 40 souris ont été thymectomisées à la naissance par la technique habituelle².

Suivant les cas, 4 à 8 animaux ont été sacrifiés: 3, 4, 5, 7, 10, 12 et 21 jours après l'immunisation. La rate a été prélevée. Une moitié congelée servira à compter les foyers d'hémolyse (FH) sur coupe mince de rate³. Les résultats ont été exprimés en nombre de FH/cm² comme nous l'avons précédemment proposé⁴; l'autre moitié, dont on se servira pour réaliser une suspension unicellulaire, sera utilisée pour dénombrer les cellules productrices d'anticorps par l'immunocyto-adhérence selon le procédé de Brozzi et al.⁵ et par la technique des plages d'hémolyse (PH) selon la méthode de CUNNINGHAM et SZENBERG⁶.

Chez les CF 1 le «background» avec la technique des FH est de 10/cm², avec celle de Brozzi de 300 rosettes/10⁶

cellules spléniques et avec la méthode de CUNNINGHAM de 1 hémolyse/10⁶ cellules spléniques.

Résultats. Ils sont indiqués dans le Tableau ci-joint. Nous pouvons ainsi faire les constatations suivantes: chez les souris thymectomisées, on ne rencontre le nombre maximum de rosettes qu'au 10e jour, au lieu du 5e jour chez les témoins indemnes, et il n'est que de 244 000 rosettes par rate contre 1 300 000 chez les souris normales, soit plus de 5 fois moins avec 5 jours de retard. De même, le nombre le plus élevé de PH chez les thymectomisées apparaît seulement au 5e jour et il n'est que de 22 000 PH/Rate contre 310 000 au 4e jour chez les souris témoins, soit 14 fois moins, avec un jour de décalage. Quant aux F.H. des animaux thymectomisés, beaucoup

¹ Travail du Laboratoire d'Hygiène - Faculté de Médecine de Lyon, Service du Professeur J. THIVOLET.

² J. THIVOLET et J. C. MONIER, Rev. fr. Étud. clin. biol. 14, 132 (1969).

³ S. E. BERGLUND, P. A. MARKEY et S. E. MERGENHAGEN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 126, 84 (1967).

⁴ J. C. MONIER et M. SEPETJIAN, Experientia, à paraître (1969).

⁵ G. BIZZI, G. STIFFEL, D. MOUTON, M. LIACOPOULOS BRIOT, C. DECREUSEFOND et Y. BOUTHILLIER, Annls. Inst. Pasteur, Lille, Supp. 110, 7 (1966).

⁶ A. J. CUNNINGHAM et A. SZENBERG, Immunology 14, 599 (1968).

Nombre de jours après immunisation	Nombre de rosettes par rate souris		Nombre de plages d'hémolyse par rate		Nombre de foyers d'hémolyse par cm ²	
	Normales	Thymectomisées	Normales	Thymectomisées	Normales	Thymectomisées
3	160 000 \pm 12 600 ^a	78 800 \pm 22 000	17 300 \pm 4 400	4 500 \pm 335	284 \pm 25	116 \pm 16
4	107 000 \pm 16 000	95 400 \pm 29 000	31 000 \pm 7 500	16 500 \pm 2 750	Confluent	120 \pm 8
5	130 000 \pm 25 000	105 300 \pm 21 000	56 000 \pm 5 200	22 000 \pm 2 100	Confluent	114 \pm 14
7	114 000 \pm 19 000	109 000 \pm 32 000	15 000 \pm 3 000	15 700 \pm 1 450	Confluent	135 \pm 28
10	113 000 \pm 23 000	244 000 \pm 65 000	10 200 \pm 850	12 000 \pm 425	170 \pm 23	97 \pm 14
12	31 000 \pm 4 500	128 000 \pm 45 000	8 100 \pm 825	7 600 \pm 320	180 \pm 28	110 \pm 9
21	180 000 \pm 8 000	35 000 \pm 17 000	400 \pm 90	350 \pm 89	170 \pm 32	113 \pm 12

^a Erreur type de la moyenne.

sont de petite taille et à aucun moment on ne rencontre de préparation confluente incomptable comme c'est le cas chez les témoins entre les 4e et 7e jours. Si nous calculons le nombre d'ilots de cellules sécrétant des anticorps anti GRM dans la rate des témoins et dans celle des thymectomisées à partir de la formule suivante que nous avons établie dans un travail précédent⁴:

$$N = \sqrt{\frac{3,14 a^3 V^3}{6n'}}$$

où: a représente le nombre de FH par cm² au moment où le nombre de PH est à son maximum, soit 284 pour les témoins et 114 pour les thymectomisés.

V : le volume de la rate en mm³, soit 100 mm³ en moyenne;

n' : le nombre de PH soit 31 000 pour les souris indemnes et 22 000 pour les animaux thymectomisés; on trouve pour les témoins: $N = 6219$ et pour les thymectomisés: $N = 5937$ ce qui représente des chiffres très voisins.

Il apparaît donc que la réponse des animaux thymectomisés est d'une part plus faible et d'autre part retardée par rapport à celle des normaux (15-16-18), que le nombre d'ilots d'hémolyse dans la rate des souris indemnes ou opérées est sensiblement le même.

De plus, la chute du nombre de PH, après le maximum, est plus rapide chez les normaux. Ainsi, du 5e au 12e jour chez les témoins, le nombre de PH tombe de 56 000 à 8 100 alors que chez les thymectomisés il passe seulement de 22 000 à 7 600.

Discussion. Il est nécessaire d'expliquer une constatation apparemment paradoxale, celle de trouver un nombre de PH 14 fois plus bas chez les thymectomisées que chez les témoins alors que le nombre N d'ilots d'hémolyse dans ces deux lots est sensiblement le même. Or, chaque ilot d'hémolyse représente³ un ensemble de cellules synthétisant les anticorps et provenant par divisions successives d'une même cellule précurseur. Donc, N est une appréciation du nombre de ces cellules précurseurs de la rate et il est sensiblement le même chez les témoins et les thymectomisées donc il n'y a pas comme cela avant été avancé⁷⁻⁹ moins de précurseurs chez les thymectomisées. Par contre, comme le nombre de cellules élaborant les anticorps est très bas chez les thymectomisées c'est que le nombre de mitoses à partir des précurseurs chez les souris opérées est plus faible que chez les témoins. On comprend ainsi que, d'une part les FH des thymectomisées aient un plus petit diamètre puisqu'il y a moins de cellules à leur niveau et que d'autre part on n'ait à aucun moment une confluence de ces FH. Donc, chez les thymectomisées le nombre des précurseurs est sensiblement normal mais il y a moins de mitoses à partir d'eux donc moins de cellules élaborant les anti-

corps. Il ne semble pas chez ces animaux, qu'individuellement chaque cellule secrète moins d'anticorps¹⁰⁻¹³.

Des travaux récents de CLAMAN et al.¹⁴ et de MILLER et al.¹⁵⁻¹⁸ nous permettent peut-être d'expliquer nos résultats. Ces auteurs ont montré que deux types de cellules lymphoïdes coopèrent pour fournir une réponse primaire normale: les «effector cells» d'origine médullaire vont donner par divisions successives des cellules sécrétant les anticorps, les «auxillary cells» provenant du thymus ne produisent pas d'anticorps mais permettent, lorsqu'elles sont associées aux précédentes, d'avoir un nombre élevé de cellules synthétisant les anticorps. Il est possible que ces auxillary cells agissent en favorisant les mitoses à partir des précurseurs et permettent d'obtenir un taux élevé de cellules sécrétantes. On pourrait ainsi comprendre que, chez les thymectomisées manquant d'auxillary cells, le nombre d'ilots d'hémolyse par rate soit analogue à celui des témoins alors que celui des PH dépendant du nombre de mitoses à partir des précurseurs soit très diminué^{19, 20}.

Summary. It appears that in thymectomized CF 1 mice the number of hemolytic plaque-forming cells is very diminished, whereas the number of precursor cells is normal. This finding suggests that in thymectomized mice precursor cells the mitosis number is lower.

J. C. MONIER²¹

Laboratoire d'Hygiène et d'Action Sanitaire et Sociale de l'Université, Lyon 8e (France), 12 juin 1969.

⁷ J. F. A. P. MILLER et G. F. MITCHELL, *Nature* 216, 659 (1967).

⁸ J. F. A. P. MILLER, G. F. MITCHELL et N. S. WEISS, *Nature* 214, 992 (1967).

⁹ J. F. A. P. MILLER et G. F. MITCHELL, Proc. First Intern. Congr. Transplantation Soc. (Ed. J. DAUSSSET; Munksgaard, Copenhagen 1967).

¹⁰ H. FRIEDMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 118, 1176 (1965).

¹¹ J. F. A. P. MILLER, P. M. DE BURGH et G. A. GRANT, *Nature* 208, 1332 (1965).

¹² K. TAKEYA, R. MORI et K. NOMOTO, Proc. Jap. Acad. 99, 831 (1964).

¹³ K. TAKEYA et K. NOMOTO, *J. of Immunology* 99, 831 (1967).

¹⁴ H. N. CLAMAN, E. A. CHAPERON et R. F. TRIPPLETT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 122, 1167 (1966).

¹⁵ J. F. A. P. MILLER et G. F. MITCHELL, *Nature* 216, 659 (1967).

¹⁶ J. F. A. P. MILLER et G. F. MITCHELL, *J. exp. Med.* 128, 801 (1968).

¹⁷ G. F. MITCHELL et J. F. A. P. MILLER, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 59, 296 (1968).

¹⁸ G. F. MITCHELL et J. F. A. P. MILLER, *J. exp. Med.* 128, 821 (1968).

¹⁹ N. R. ST. C. SINCLAIR, *Immunology* 12, 549 (1967).

²⁰ N. R. ST. C. SINCLAIR, *Immunology* 12, 559 (1967).

²¹ Avec l'aide technique de Madame D. TILLE.