

- 1 This work was supported in part by National Institute of Health. We thank Marianne Gaschler for her technical help.
- 2 K.N. Prasad and P.K. Sinha, *In Vitro* 12 (1975).
- 3 P.H. Fishman, R.M. Bradley and R.C. Henneberry, *Archs. Biochem. Biophys.* 172, 618 (1976).
- 4 A. Leder and P. Leder, *Cell* 5, 319 (1975).
- 5 N.K. Ghosh, S.E. Deutsch and M.J. Griffin, *J. Cell Physiol.* 86, 663 (1975).
- 6 K.N. Prasad and A.W. Hsie, *Nature New Biol.* 233, 141 (1971).
- 7 K.N. Prasad, B. Mandal, J.C. Waymire, G.J. Lees, A. Verna-dakis and N. Weiner, *Nature New Biol.* 241, 117 (1973).
- 8 K.N. Prasad, *Nature* 234, 471 (1971).
- 9 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 10 K.N. Prasad, *Biol. Rev.* 50, 129 (1975).
- 11 K.N. Prasad and A. Sakamoto, *Experientia* 34, 1575 (1978).
- 12 K.N. Prasad, R. Prasad, N. Prasad, J.E. Harrell, *Radiology*, submitted for publication.
- 13 A. Sakamoto, K.N. Prasad, *Cancer Res.* 32, 532 (1972).
- 14 B. Mendel, M. Bauch and F. Strelitz, *Klin. Wschr.* 10, 116 (1931).
- 15 M.A. Apple and D.M. Greenberg, *Cancer Chemotherapy Rept.* 52, 687 (1968).
- 16 B.C. Giovanella, W.A. Lohman and C. Heidelberger, *Cancer Res.* 30, 1623 (1970).
- 17 A.C. Sartorelli, E.J. Schoolar, Jr, and P.F. Kruse, Jr, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 104, 266 (1960).
- 18 A.C. Aisenberg and H.P. Morris, *Nature* 191, 1314 (1961).
- 19 H. Eagle, S. Barban and M. Levy, *J. biol. Chem.* 233, 551 (1958).
- 20 E.G. Goldberg and S.P. Colowick, *J. biol. Chem.* 240, 2786 (1965).
- 21 G. Weber and J.A. Lea, in: *Methods in Cancer Research*, pp. 523. Ed. H. Busch. New York, Academic Press, 1967.

Action du *Corynebacterium parvum* sur les taux de lysozyme (muramidase) sérique

Effect of *Corynebacterium parvum* on serum lysozyme (muramidase) levels

G. Eliopoulos¹, S. Andre, N.P. Anagnou¹, J. Meletis¹ et B. Halpern

Institut d'Immunobiologie de l'INSERM et de l'Association Claude Bernard, Hôpital Broussais, 96, rue Didot, Paris 14e (France), 9 octobre 1978

Summary. An i.v. injection of 548 µg of killed *Corynebacterium parvum* into C57B1 mice leads to significant changes in serum lysozyme (muramidase) levels. After an initial fall at 24 h, the activity of the enzyme increased progressively, reached a peak on the 9th day and returned to control range after the 15th day.

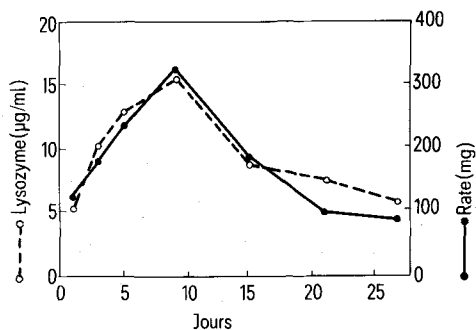
L'injection i.v. ou i.p. d'une suspension de *Corynebacterium parvum* tué, exerce chez la souris une action protectrice vis-à-vis d'un certain nombre d'infections expérimentales²⁻⁴. Il a été suggéré que cet effet protecteur était lié au pouvoir de la bactérie d'une part, de stimuler le système réticulo-endothélial^{2,5} et d'autre part, d'augmenter la bactéricidie intracellulaire des macrophages⁴. Pourtant, des facteurs humoraux sont également impliqués dans le processus de défense de l'organisme. Dans le présent travail, on étudie l'action du *C. parvum* sur les taux d'une enzyme bactériolytique, du lysozyme (muramidase), dans le sérum.

Matériel et méthode. Des souris C₅₇B1 mâles, isogéniques, âgées de 10 à 12 semaines et d'un poids moyen de 20 g ont été utilisées dans toutes les expériences. Les animaux étaient soumis au temps zéro à une seule injection i.v. de 548 µg de *C. parvum* (Inst. Mérieux, Lyon). Le sang de divers groupes d'animaux ainsi traités, était prélevé par ponction retro-orbitaire dans les jours qui suivirent cette unique injection. Les taux de lysozyme sérique étaient évalués suivant la technique de Litwack⁶ en utilisant comme substrat le *Micrococcus lysodeikticus* (Worthington Biochem. Corp., New Jersey).

Résultats. Les résultats sont présentés dans la figure. Après un declin initial au bout de la 24e heure, les taux de lysozyme sérique augmentent progressivement et donnent un pic 9 jours après l'injection de la bactérie. Ensuite, la courbe commence à décroître et des taux normaux s'observent à partir du 15e jour. Ces modifications d'enzyme dans le sérum suivent d'une manière hautement significative les modifications du poids de la rate ($p < 0.001$). Une faible liaison a également été trouvée entre les taux de lysozyme et le nombre de monocytes circulants ($p < 0.05$).

Discussion. Les granulocytes et les monocytes du sang, ainsi que les macrophages tissulaires sont considérés actuelle-

ment comme étant les cellules-sources de lysozyme sérique les plus importantes⁷⁻¹⁰. D'autre part, il a été observé que l'injection du *C. parvum* chez la souris entraînait une augmentation très importante du nombre de granulocytes et monocytes du sang¹¹. Une hypertrophie du foie et de la rate a également été notée 3-15 jours après l'injection de la bactérie⁵. Des études histologiques ont montré que l'hépatomégalie était en grande partie constituée par l'augmentation numérique des cellules de Kupffer^{12,13}. La splénomégalie était essentiellement due à l'accumulation dans la rate des cellules d'aspect macrophagiques et d'autres cellules mononucléaires issues de la moelle osseuse¹⁴. Il est donc bien évident que l'augmentation des taux de lysozyme sérique observée chez les animaux traités par *C. parvum*, reflète le renouvellement intense et accéléré des granulocytes et monocytes circulants et probablement des macrophages tissulaires. La forte liaison trouvée entre les taux



Modifications des taux de lysozyme sérique et du poids de la rate chez les animaux traités par *C. parvum* en fonction du temps.

d'enzyme dans le sérum et le poids de la rate représenterait peut-être le degré de destruction de ces cellules dans la rate, étant donné que le lysozyme ne se libère dans la circulation qu'après la mort de la cellule productrice de celui-ci¹⁵.

- 1 Adresse actuelle: 1st Department of Internal Medicine, University of Athens School of Medicine, Vassilevs Pavlos Hospital, Athens 609, Greece.
- 2 B. Halpern, Bull. Ass. Fr. Vét. Microbiol. Immunol. 7, 3 (1971).
- 3 C. Adlam, E.S. Broughton et M.T. Scott, Nature New Biol. 235, 219 (1972).
- 4 R.M. Fauve, dans: *Corynebacterium parvum*. Applications in experimental and clinical Oncology, p.77. Ed. B. Halpern. Plenum Press, New York and London 1975.
- 5 B. Halpern, A.R. Prévot, G. Biozzi, C. Stiffel, D. Mouton, J.C. Morard, Y. Bouthillier et C. Decreusefond, J. reticuloendoth. Soc. 1, 77 (1964).
- 6 G. Litwack, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 89, 401 (1955).
- 7 R.S. Briggs, P.E. Perillie et S.C. Finch, J. Histochem. Cytochem. 12, 167 (1966).
- 8 M.E. Carson et A.M. Dannenberg, J. Immunol. 94, 99 (1965).
- 9 E.F. Osseman et D.P. Lawlor, J. exp. Med. 124, 921 (1966).
- 10 M.E. Fink et S.C. Finch, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 127, 365 (1968).
- 11 G. Eliopoulos, Thèse d'Etat, Paris 1977.
- 12 A.E. Stuart, dans: *Reticuloendothelial system*, p.156. Livingstone, London 1970.
- 13 B. Halpern, A. Fray, Y. Crepin, O. Platica, A-M. Lorinet, A. Rabourdin, L. Sparros et R. Isac, Ciba Found. Symp. 18, 217 (1973).
- 14 L. Dazord, L. Toujas, M.P. Ramee et J. Guelfi, Annl. Immunol. Inst. Pasteur (Paris) 124C, 375 (1973).
- 15 C.G. Craddock, dans: *Hematology*, p.593. Ed. W. Williams. McGraw-Hill Book Comp., New York 1972.

Effects of cadmium on the immune system of mice*

S. Müller, K.-E. Gillert, Ch. Krause¹, G. Jautzke², U. Gross² and T. Diamantstein^{3,4}

Robert Koch-Institut, Nordufer 20, D-1000 Berlin 65 (West), und Klinikum Steglitz, Hindenburgdamm 30, D-1000 Berlin 45 (West), 4 October 1978

Summary. Chronic oral exposure of mice to Cd⁺⁺ inhibits cell-mediated immunity of delayed type hypersensitivity induced by sheep red blood cells (SRBC). No effect was detected on humoral immune response to SRBC. Spleen cells derived from mice exposed to Cd⁺⁺ showed *in vitro* enhanced response to T and B cell mitogens. These results demonstrate that Cd⁺⁺ exposure alters the immune system of mice.

It has been reported that cadmium, known as an environmental contaminant, alters the antibacterial defense mechanisms^{5,6}. This alteration seems to be due especially to an impairment of the function of phagocytic cells⁶. As tested in rabbits, Cd⁺⁺ given in subtoxic doses results in decreased circulating antibody titers⁷ and diminishes the humoral immune response of mice to sheep red blood cells (SRBC) as measured by the number of antibody forming cells in the animal spleen. Therefore, it has been claimed that the decreased antibody titers after Cd⁺⁺ treatment might be due to the impairment of the clonal expansion of the specific B lymphocytes⁸. Recently, we showed an impairment of the T cell-mediated, macrophage-dependent, cellular immune response of mice by subtoxic doses of lead⁹.

In this study we present results concerning the effect of chronic Cd⁺⁺ exposure a) on cell-mediated immunity (delayed type hypersensitivity=DTH) induced by SRBC, b) antibody production to SRBC and c) function of splenic T and B lymphocytes *in vitro*. Cd⁺⁺ was given orally, since this route can be considered as relevant for intoxication with Cd⁺⁺ as an environmental agent. In the form of cadmium acetate 30, 300 and 600 ppm Cd⁺⁺ were administered to mice *ad libitum* with drinking water for 10 weeks. This dose range is reported to be subtoxic and to be inhibitory for humoral immune response in mice⁸. Histological studies revealed no morphological changes of kidneys, small and large intestine, thymus, and lymph nodes, but a dose-dependent decrease of the white spleen pulp, cell necrosis in liver and inflammatory infiltrates and edema in the cardia, especially in mice, which showed the highest cadmium level in the serum.

Cd⁺⁺ resorption was measured in the sera of specimens by atomic absorption spectrophotometry (AAS) in a range of

0.2 up to 4.0 µg/100 ml serum. The cadmium range of normal individuals is between 0.17 up to 0.23 µg/100 ml serum^{10,11}. This reveals the possibility that the Cd⁺⁺ doses detected in mice after exposure is in a similar range as in Cd⁺⁺-burdened humans.

Groups of Cd⁺⁺-treated and control mice were sensitized with SRBC and challenged by a single intracutaneous footpad injection of the antigen to provoke a specific DTH-reaction. The intensity of the DTH-reaction was measured by the footpad swelling due to the inflammatory response^{11,12}. In parallel, the influx of ¹²⁵I-HSA into the inflammatory area was determined¹³.

As shown in figure 1, DTH reactions were inhibited in mice fed with Cd⁺⁺. The inhibition of DTH by Cd⁺⁺ was related to the concentration detected in the serum of the animals.

To test the effect of Cd⁺⁺ on the humoral immune response, groups of mice treated as described above were injected i.p. with 2 × 10⁸ SRBC. 5 days after immunization, the number of IgM and IgG antibody producing cells in the spleen of Cd⁺⁺-treated and non-treated mice was determined by the plaque test according to Cunningham and Szenberg¹⁴, as described in detail by Diamantstein et al.¹⁵. Mice treated even with 600 ppm of Cd⁺⁺ showed no significantly reduced quantity of anti-SRBC-plaque forming spleen cells (IgM: 446,285 ± 45,000/spleen, IgG: 566,000 ± 154,000/spleen) as compared to the non-treated mice (IgM: 504,571 ± 49,000/spleen, IgG: 740,000 ± 100,450/spleen). In another experiment, mice were fed with 100 ppm Cd⁺⁺ for 10 weeks and then immunized with 2 × 10⁸ SRBC. No influence of Cd⁺⁺ on the circulating antibody titers could be observed after the primary immune response against SRBC and secondary challenge with SRBC 4 weeks later (data not shown). These results are in contrast to those reported by Koller et al.⁸.