

of venous thrombosis; they also provide evidence of the prominent role of plasma in regulating platelet adhesiveness.

Riassunto. È stato dimostrato mediante prove crociate e la osservazione del comportamento di piastrine lavate risospese in PPP venoso o arterioso che la causa della maggior risposta delle piastrine venose rispetto a quella delle piastrine arteriose all'ADP è nel plasma.

La responsività all'ADP aumenta col tempo di incubazione nel plasma delle piastrine lavate.

D. BOTTECCHIA and MARIA GABRIELLA DONI

*Institute of Human Physiology,
Faculty of Medicine, Padua University, Via Marzolo 3,
I-35100 Padova (Italy), 28 July 1972.*

Action des différentes formes actives de la vitamine A sur le mécanisme immunitaire chez le rat

On désigne généralement sous le nom de vitamine A le rétinol; vitamine A1; ou axérophthol, mais aussi dérivés physiologiquement actifs dans l'organisme animal. Plusieurs formes chimiques de vitamine A ont été mises en évidence, ainsi que leurs stéro-isomères. Ils ne diffèrent entre eux que par leur activité biologique, présente dans les tissus.

Depuis longtemps, cette vitamine est considérée surtout comme une vitamine qui lutte contre l'infection, d'où son appellation d'anti-infectieuse. Les travaux sur la vitamine A sont nombreux dans plusieurs domaines: son rôle dans le mécanisme photorécepteur de l'œil^{1,2}; son transport, son absorption, et son stockage^{3,4}, son effet sur la majeure partie des voies métaboliques et hormonales de l'organisme notamment dans le métabolisme glucidique⁵, lipidique⁶, et protidique⁷ ont été largement étudiés. Bien que les relations entre carence en vitamine A et infection soient étroitement liées et exercent ensemble un effet synergétique dans l'organisme hôte, l'action de cette vitamine sur la réactivité immunitaire n'est pas encore élucidée. La vitamine A, qui exerce un effet manifeste sur l'intégrité des membranes des organites cellulaires⁸, ainsi que sur les enzymes lysosomales⁹, et dont l'effet est semblable à celui des substances adjuvantes de l'immunité (toxines, antigènes cellulaires, produits carbohydratés, détergents non ioniques) pourrait-elle avoir une action sur le mécanisme immunitaire?

DRESSER¹⁰, en 1968, montra que le rôle de la vitamine A (rétinol) est celui d'une substance adjuvante de l'immunité à cause de sa destruction des membranes lysosomales ce qui entraîne une stimulation de la division cellulaire. En injectant à une souris des quantités différentes de *Bordetella pertussis* en présence de la globuline γ de bœuf (0-5 mg), la réponse immunitaire obtenue est fonction de la quantité d'adjuvant et d'antigène utilisée. DRESSER observa un effet similaire lorsqu'une même quantité de globuline γ de bœuf (0,5 mg) est injectée à une souris ayant déjà reçu différentes quantités de vitamine A

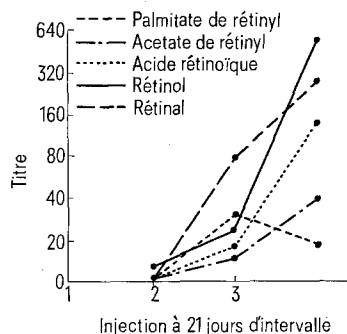
(rétinol) (1-10 mg). Cette possibilité de stimulation en présence de l'antigène dans la cellule conduit à une réponse immunitaire.

Dans ce travail sont exposés les résultats de l'adjuvantité des différentes formes actives de la vitamine A en présence d'un antigène qui est: la globuline γ de bœuf (BGG). L'expérience entreprise pour cette étude comprenait 48 Sprague Dawley rats mâles, âgés de 4-5 semaines et divisés en 6 groupes. Ces rats sont soumis à un régime normal. Le No 1 sert de témoin. Les 5 autres groupes reçoivent chacun une injection sous-cutanée de 16,500 UI (environ 5 mg) de l'une des formes actives de la vitamine A dissoute dans 0,5 ml d'huile de paraffine (substance non immunogène et non adjuvante en elle-même). Les formes actives injectées de vitamine A sont: Le Rétinol (vitamine A alcool synthétique crist., K.L. Laboratories 5674); le rétinol (vitamin A aldehyde, Hoffman La Roche LTD., RO-01-6015/005); la vitamine A acetate crist. pure (K.L. Laboratories 5673t); la vitamine A palmitate (K.K. Laboratories Inc. 19862); et enfin l'acide rétinolique (Hoffman La Roche Lot. A. 263754).

Les 6 groupes de rats reçoivent après 24 h une injection i.p. de 1 mg de globuline γ de bœuf (BGG fraction II, Armour & Co) dans 0,1 ml. de NaCl 0,85/100. Le titre d'anticorps produit est déterminé par la technique de l'hémagglutination passive¹¹ au 21^e jour, après chaque injection de vitamine A et d'antigène (Figure).

En examinant ce graphique, on remarque la forte adjuvantité de la vitamine A (Rétinol) et (Rétinal) comparée aux effets adjuvantitaires donnés par les autres formes actives utilisées, c'est-à-dire l'acide rétinolique, la vitamine A acetate et palmitate. Il est à signaler aussi l'absence des anticorps provoqués par la globuline γ administrée uniquement aux rats témoins.

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des différentes formes actives de la vitamine A considérée comme substance adjuvante de la réactivité immunitaire chez le rat, et nous avons mis en évidence l'adjuvantité notable du rétinol et du rétinol par rapport aux autres dérivés actifs de cette vitamine en présence de la globuline γ de bœuf laquelle s'est montrée chez le rat témoin comme un antigène non immunogène en lui-même. Bien que la vita-



Adjuvantité des différentes formes actives de la vitamine A en présence de la globuline γ de bœuf.

¹ G. WALD, *Vitamins Horm.* 18, 417 (1960).

² K. D. FISCHER et C. G. CARR, *Fedn. Proc.* 205, 1605 (1970).

³ T. MOORE, *Vitamin A P151* (Elsevier Amsterdam 1957).

⁴ J. GANGULY, *Vitamins Horm.* 18, 387 (1960).

⁵ H. CHANDRA, G. VENKATACHALAM, B. V. BELAVDDY et P. REDDY, *Indian J. Child Health* 9, 589 (1960).

⁶ G. ARROYAVE, F. VITERI, M. BEHAR et N. S. SCRIMSHAW, *Am. J. clin. Nutr.* 7, 185 (1957).

⁷ G. A. PITT et R. A. MORTON, *Rev. Biochem.* 31, 491 (1962).

⁸ J. A. LUCY et J. T. DINGLE, in *Metabolism and Significance of Lipids* (Dawson Rhodes, London, New York 1964).

⁹ J. T. DINGLE, *Biochem. J.* 79, 509 (1961).

¹⁰ D. W. DRESSER, *Nature, Lond.* 217, 527 (1968).

¹¹ A. B. J. STAVITSKY, *Immunology* 72, 360 (1954).

mine A manque d'antigénécité, elle possède donc une adjuvantité extrinsèque en présence de la globule line γ dont elle intensifie la réponse immunitaire.

Summary. In this work, we have studied the role of different active forms of vitamin A considered as adjuvant of the immune mechanism in the rat. We also pointed out the adjuvant effect of retinol and retinal in comparison with the other active components of that vitamin with the bovine γ -globulin which is not an immunogenic antigen in itself in the control rat. Despite the fact that vitamin A has no antigenicity, it still possess an

extrinsic adjuvanticity in presence of bovine γ -globulin. The degree of the immune response is increased.

M. F. CHARABATI¹² and D. S. McLAREN¹³

Nutrition Research Program, American University of Beirut, Beirut (Lebanon), 1 August 1972.

¹² Supporté par le C.N.R.S., Liban.

¹³ Professeur de nutrition clinique Université Américaine, Beirut (Liban).

Immunochemical Characterization of the Multimolecular Forms of Squid Ink Gland Tyrosinase

The primary function of the ink gland of squid (*Loligo pealii*) is the continuous production of the enzyme tyrosinase (E.C. 1.10.3.1) which mediates the conversion of tyrosine and L-Dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine) to melanin. SZABO¹ reported that the squid ink gland contains folds of connective tissue which are lined with simple columnar epithelial cells, and these cells secrete melanin which is the major component of the squid ink. Numerous small vacuoles which may be filled with melanin (ink) granules are found at the apical regions of these cells¹. The melanin granules are secreted into the lumen of the ink gland and then transferred to the ink sac until the ink is expelled from the organism as a defense mechanism. The present communication is concerned with the immunochemical characterization of the molecular forms of squid ink gland tyrosinase.

Methods and materials. Ink glands employed in this study were excised from squid collected off the coast of Falmouth, Mass. Tyrosinase extracts were prepared by homogenization of washed ink glands in a 0.25 M sucrose solution. The homogenate was then centrifuged at 600 $\times$ g for 10 min to remove cellular debris. This was

followed by further sedimentation at 105,000 $\times$ g for 60 min and the resulting supernatant was used in all investigations cited. Hardy-Passey mouse melanoma and human melanoma tyrosinase were extracted by the methods of BURNETT^{2,3}.

Rabbit antiserum to squid tyrosinase was obtained by the method reported by CAMPBELL⁴. Immunodiffusion plates were prepared by a modification of the technique of CLAUSEN⁵. Immunelectrophoresis was performed on Agarose Universal Electrophoretic Films (Analytical Chemists, Inc., Palo Alto, Calif.) which were manufactured according to the formulations of ELEVTCH⁶. After the formation of precipitin lines in the immunodiffusion and immunoelectrophoresis plates, the presence of specific tyrosinase-antibody complexes was detected by the method of BURNETT⁷.

Results. It can be seen in Figure 1 that only squid tyrosinase combined with the antiserum to squid tyrosinase. Two precipitin lines were detectable by the L-Dopa detection technique, however, the sensitivity of this technique was not of the same standard as immunoelectrophoresis described below. No L-Dopa-positive lines were discerned with the Hardy-Passey mouse melanoma and the human melanoma tyrosinase contained in wells 3 and 6 and wells 2 and 5 respectively.

Upon immunoelectrophoresis, 3 Dopa-positive precipitin lines were resolved for the squid tyrosinase. Two of these lines, designated T1 and T2, possessed similar electrophoretic mobilities but differed immunochemically (Figure 2). The slowest migrating precipitin line, which was termed T3, displayed antigenic similarity to T2. The immunochemical relationship of T1 and T2 and T3 could not be elucidated because of the distance between the precipitated lines in the immunoelectrophoresis plates.

The fact that the Dopa-positive precipitin lines represented the presence of tyrosinase and not a non enzymatic darkening was ascertained by heat inactivation studies. Squid tyrosinase is completely inactivative by

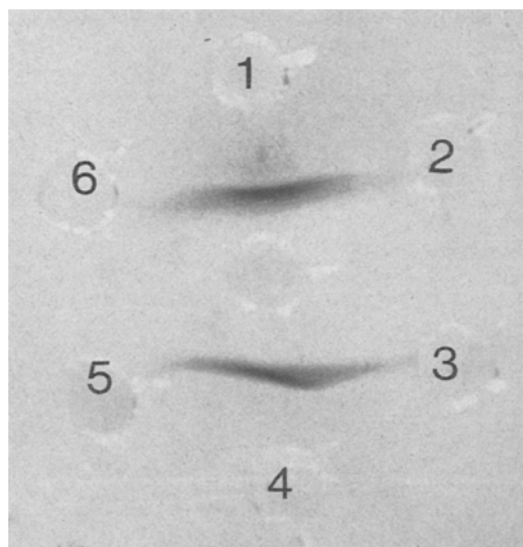


Fig. 1. Immunodiffusion plate containing 5 μ l squid tyrosinase (peripheral wells 1 and 4), 5 μ l human melanoma tyrosinase (wells 2 and 5), and 5 μ l Hardy-Passey mouse melanoma tyrosinase (wells 3 and 6). The central well is filled with 5 μ l anti-squid tyrosinase serum.

¹ G. SZABO, *Am. Zool.* 6, 211 (1966).

² J. B. BURNETT and H. SEILER, *J. Invest. Dermat.* 27, 880 (1967).

³ J. B. BURNETT and H. SEILER, *J. Invest. Dermat.* 52, 199 (1969).

⁴ D. H. CAMPBELL, J. S. GARVEY, N. E. CREMER and D. H. SUSSDORF, *Methods in Immunology* (W. A. Benjamin, Inc., New York 1963), p. 97.

⁵ J. CLAUSEN, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Eds. T. S. WORK and E. WORK, North Holland Publ. Co., Amsterdam 1969), p. 515.

⁶ F. R. ELEVTCH, S. B. ARONSON, T. V. FEICHTMEIR and M. L. ENTERLINE, *Am. J. clin. Path.* 46, 692 (1966).

⁷ J. B. BURNETT, H. SEILER and V. BROWN, *Cancer Res.* 1, 880 (1967).