

Treatment of T lymphocytes with a variety of agents inhibits rosetting. These include trypsin³, iodacetate³, azide⁴, phospholipase A⁵, neuraminidase⁶, sodium cyanide⁷, iodoacetamide⁸, azathioprine⁹, cytochalasin B¹⁰, and antilymphocyte serum⁷. All these agents have widespread membrane damaging properties or are metabolic inhibitors and cell poisons. Our observation of a similar effect with eserine and phospholipase D suggests that the integrity of membrane-bound cholinesterase is essential for the bond between SRBC and T lymphocytes. Eserine specifically inhibits cholinesterase, increases erythrocyte fragility¹¹ and cellular depletion of potassium¹². Phospholipase D splits the link between phosphoric acid and choline in the lecithin molecule and releases cholinesterase with consequent depletion of membrane-bound enzyme. Blast cells from patients with acute lymphoblastic leukemia do not form rosettes with SRBC nor do these bear surface immunoglobulin determinants^{13,14}. The failure of such neoplastic cells to form rosettes may possibly be due to their low cholinesterase activity^{15,16}.

There is a growing appreciation that membranes are dynamic structures that participate in regulatory mechanisms though the precise role played by them is unclear. The extremely heterogeneous lipid composition, chemistry and structure are very important to the properties and functions of membranes. Spin label techniques show that the lipids of most functional membranes under physiological conditions are largely in a fluid rather than a rigid state¹⁷. Based on calorimetry¹⁸ and X-ray diffraction studies¹⁹, the phospholipids seem to be arranged asymmetrically across the two halves of the lipid bilayer. The integral proteins, as opposed to the peripheral proteins, are directly involved with the lipids in determining the structure of the membrane matrix²⁰. The carbohydrates apparently project from the outer membrane surface,

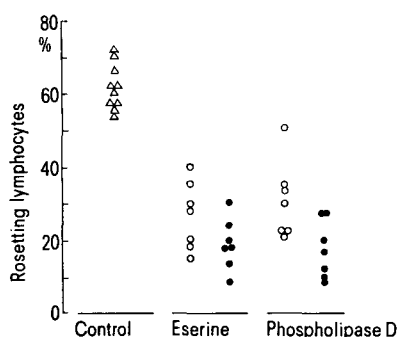
where they may be involved in cell contact and interaction. Our studies have shown that cholinesterase exerts a stabilizing influence on lipoproteins, in the serum²¹ as well as in cell membranes²². It is possible that lipid-cholinesterase-protein interaction contributes to the stability and function of surface membrane of cells, including SRBC and lymphocytes.

Inhibition of human T lymphocyte-SRBC rosetting by eserine and phospholipase D suggests that membrane-bound acetylcholinesterase exerts a modulating influence on the receptors involved in this phenomenon²³.

Résumé. La formation de rosettes entre les lymphocytes T humains et les globules rouges du mouton est inhibée par l'ésérine et la phospholipase D. Cela suggère que l'acétylcholinesterase liée aux membranes influence les récepteurs impliqués dans la formation des rosettes.

R. K. CHANDRA and K. MADHAVANKUTTY

Janeway Child Health Centre and Memorial University of Newfoundland, St. John's (Newfoundland, Canada), 28 January 1975.



Percent of T lymphocytes forming SRBC rosettes. SRBC (○) or lymphocytes (●) were pretreated for 1 h at 37°C with eserine (1×10^{-3} M, 1.25 mg/ml) or with phospholipase D (0.62 mg/ml). Each value is the mean of duplicate experiments set up on 1 day. Control figures are shown as Δ.

- ⁴ Z. BENTWICH, S. D. DOUGLAS, F. P. SIEGAL and H. G. KUNKEL, Clin. Immun. Immunopath. 7, 511 (1973).
- ⁵ H. M. CHAPPEL, Transplantation 15, 320 (1973).
- ⁶ S. WHITTINGHAM and I. R. MACKAY, Cell Immun. 6, 362 (1973).
- ⁷ P. BRAIN, J. GORDON and W. A. WILLETS, Clin. exp. Immun. 6, 681 (1970).
- ⁸ S. S. FROLAND, Scand. J. Immun. 1, 269 (1972).
- ⁹ J. F. BACH, M. DARDENNE and C. FOURNIER, Nature, Lond. 222, 998 (1969).
- ¹⁰ J. H. KERSEY, D. J. HOM and P. BUTTRICK, J. Immun. 112, 862 (1974).
- ¹¹ M. MILSTOC and A. H. WOLFSON, Am. J. clin. Path. 57, 494 (1972).
- ¹² M. E. GRIEG and W. C. HOLLAND, Arch. Biochem. 23, 370 (1949).
- ¹³ R. D. COLLINS, J. L. SMITH, G. P. CLEIN and C. R. BARKER, Br. J. Haemat. 26, 615 (1974).
- ¹⁴ R. K. CHANDRA, unpublished data.
- ¹⁵ I. N. ZEFIROV, Vop. Pedol. Okhr. Materin. Detst. 10, 53 (1965).
- ¹⁶ B. S. HORTON, A. SCHERNOFF and R. W. MEADOWS, Cancer 26, 904 (1970).
- ¹⁷ W. L. HUBBELL and H. M. MCCONNELL, Proc. natn. Acad. Sci., USA 61, 12 (1968).
- ¹⁸ J. M. STIEM, M. E. TOURTELOTTE, J. C. REINERT, R. N. McELHANEY and R. L. RADER, Proc. natn. Acad. Sci., USA 63, 104 (1969).
- ¹⁹ M. H. F. WILKINS, A. E. BLANCK and D. M. ENGELMAN, Nature, Lond. 230, 72 (1971).
- ²⁰ S. J. SINGER, Adv. Immun. 19, 1 (1974).
- ²¹ K. M. KUTTY and C. D. ACHARYA, Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 126, 28 (1972).
- ²² K. M. KUTTY, S. PETERSON, V. AVARA and R. MILLEY, Abstr. Commun. 9th Meeting Fedn. Eur. Biochem. Soc. (1974), p. 224.
- ²³ This work was supported by a grant from the Canadian Heart Foundation.

Défaut d'incorporation du soufre dans le thymus des souris autoimmunes Swan âgées

Defect of Incorporation of S in Old Swan Autoimmune Mice Thymus

CLARK¹ a montré qu'il existait un parallélisme net entre l'incorporation de soufre radioactif dans les cellules réticuloépithéliales du thymus, sous forme d'un complexe macro-moléculaire et le taux de multiplication des thymocytes dans cet organe. Aussi considère-t-il cette incorporation de soufre comme un test d'activité fonctionnelle thymique. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé cette exploration chez les souris Swiss

normales et chez les souris autoimmunes Swan^{2,3} pour étudier l'état fonctionnel du thymus de ces animaux. Nous avons en effet déjà pu mettre en évidence chez les

- ¹ S. L. CLARK JR., J. expl. Med. 128, 927 (1968).
- ² J. C. MONIER, J. THIVOLET et M. SEPETJIAN, Anns Inst. Pasteur 116, 646 (1969).
- ³ J. C. MONIER, J. THIVOLET, A. J. BEYVIN, J. C. CZYBA, D. SCHMITT et D. SALUSSOLA, Path. Europ. 6, 357 (1971).

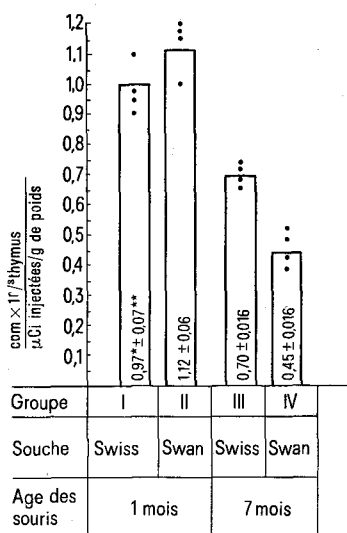
Swan un déficit précoce du thymus et des cellules T objectivé par une chute de l'activité «thymosine like» circulante⁴ une mauvaise réponse à un Ag thymodépendant: le GRM, une faible réponse des splénocytes à la PHA, une très faible compétition antigénique (ce phénomène étant normalement thymodépendant⁵).

Matériel et technique. Nous avons utilisé 16 souris Swiss⁶ et 16 souris Swan. Dans chacun de ces groupes une moitié des souris est âgée de un mois et l'autre de 7 mois.

Protocole opératoire. Tous les animaux reçoivent le même jour par voie i.p. 10 μ Ci de sulfate 35 S de sodium par g de poids. 12 h après les souris sont sacrifiées et la totalité du thymus prélevée. Ces organes sont ensuite groupés 2 par 2 dans chaque groupe de souris puis placés dans 1 ml d'eau distillée et homogénéisés 1 min environ dans un appareil de Poter. L'homogénat est alors centrifugé à 12.000 g pendant 30 min à 4°C, le surnageant limpide est prélevé; un volume de 0,4 ml de ce surnageant est déposé au sommet d'une colonne de gel de polyacrylamide: (Biogel, Calbiochem. P2) de 9 x 550 mm. (La colonne avait d'abord été équilibrée avec du tampon PO_4 0,05 M, pH 7,1 selon SORENSEN) puis élué avec le même tampon à une vitesse d'élution de 0,3 ml/min, les fractions recueillies étant de 2 ml. Le soufre marqué de chacune de ces fractions est recherché de la façon indiquée par CLARK¹ à l'aide d'un scintillateur gamma pour échantillons liquides (Nuclear Chicago). Les résultats sont exprimés en

$$\frac{\text{cpm} \times 10^{-3} / \text{thymus}}{\mu\text{Ci injectées/g de poids de l'animal}}$$

qu'on monmeta index fonctionnel.



* Moyenne arithmétique; ** erreur standard; ● les points représentent les valeurs individuelles par échantillon. L'étude statistique de la différence entre 2 moyennes est réalisée à l'aide du *t* de Student: I et II, non significative; I et III, $p < 0.025$; II, III et IV, $p < 0.0005$.

Résultats. Le soufre macromoléculaire de l'extrait correspondant au soufre minéral incorporé dans les cellules réticuloépithéliales du thymus se situe dans les fractions 6 et 7 alors que le soufre minéral libre passe dans les fractions 12, 13, 14 et 15. Le tableau indique les résultats obtenus dans les 4 groupes de 8 souris chacun.

L'index fonctionnel n'est pas significativement différent pour les Swiss et les Swan de 1 mois par contre la différence est significative entre les index fonctionnels des Swiss et Swan de 7 mois ainsi qu'entre ceux des Swiss de 1 et 7 mois et des Swan de 1 et 7 mois (*t* de Student).

Discussion. L'index fonctionnel du thymus des souris normales diminue significativement avec le vieillissement mais cette chute est beaucoup plus nette chez les Swan. Ainsi l'index fonctionnel du thymus des souris Swan âgées de 7 mois est à la fois beaucoup plus bas que celui des témoins Swiss de même âge et que celui des jeunes Swan. Ce résultat va dans le même sens que ceux que nous avons déjà obtenus chez les Swan, c'est à dire une altération précoce du fonctionnement du thymus de ces souris autoimmunes. Le produit macromoléculaire soufré des cellules réticuloépithéliales du thymus n'est pas encore identifié. Il peut représenter soit un des éléments des systèmes enzymatiques des cellules réticuloépithéliales nécessaire à la production de l'hormone thymique, soit l'hormone thymique elle-même (ou son précurseur). Cette dernière interprétation peut s'accorder avec la mise en évidence par GOLDSTEIN, de petites quantités de cystéine et de méthionine dans sa thymosine.⁷

Summary. A diminution of the incorporation of radioactive S in epithelial cells of the thymus of auto-immune Swan mice is shown. This defect of incorporation seems to be in relation to a thymus deficiency.

J. C. MONIER, C. QUINCY⁸, D. SALUSSOLA et M. SEPETJIAN

Laboratoire de Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène, Université de Lyon I, Domaine Rockefeller, 8, Avenue Rockefeller, F-69373 Lyon-Cedex 2 (France), et Laboratoire de Biochimie, Hôpital Neurologique, 59, Boulevard Pinel, F-69003 Lyon (France), 13 janvier 1975.

⁴ M. DARDENNE, J. C. MONIER, G. BIOZZI et J. F. BACH, Clin. exp. Immun. 17, 339 (1974).

⁵ J. C. MONIER et M. ROBERT, Annls. Immun. Inst. Pasteur 125C, 405 (1974).

⁶ Centre d'Elevage du C.N.R.S., Orléans la Source, France.

⁷ Nous remercions vivement les Professeurs ESPINASSE et BIZOLLON pour l'aide qu'ils nous ont apportée.

⁸ Laboratoire de Biochimie, Hôpital Neurologique, 59, Boulevard Pinel, F-69003 Lyon, France.

Pre- and Postnatal Distribution of Lipids in the Liver of Genetic Diabetic Mice

It is well established that infants of diabetic mothers are frequently larger than those of non-diabetic mothers. This increase in body weight was accounted for by an increase in total fat content¹. High fat contents in still born infants of diabetic women were confirmed by direct estimation². Similar observations were reported in the fetuses of streptozotocin diabetic rats³. ANGERSALL et al.⁴

found an increase in neutral fat with no changes in total lipids in the overweight newborn of alloxan diabetic rats. On the other hand, SOLOMON⁵ observed no increase in body lipids of the overweight fetuses of the subdiabetic (alloxan) rats. The present study was designed primarily to examine the pre- and postnatal changes of lipids in the fetal liver of the normal (Swiss albino) and KK (genetic