

STUDIORUM PROGRESSUS

Injection à des souris nouveau-nées de cellules hématopoïétiques homologues de donneurs adultes ou embryonnaires. Fréquence de la greffe érythroblastique et de la « Runt Disease »

Historique. La démonstration en 1945 par OWEN¹ que des veaux jumeaux dizygotes, les «free martins», étaient des chimères hématologiques a imposé une double notion: a) une greffe réciproque de cellules érythroblastiques a eu lieu pendant la vie embryonnaire; b) cette greffe n'a pas été rejetée par l'animal parvenu à l'âge adulte.

De cette observation naturelle découle la théorie émise pour la première fois en 1949 par BURNET et FENNER², selon laquelle la réponse d'animaux immatures au point de vue immunologique à l'injection de cellules homologues serait l'induction d'une tolérance et non d'une préimmunisation.

La première démonstration expérimentale du bien fondé de cette théorie a été apportée par BILLINGHAM, BRENT et MEDAWAR³ en 1953: l'injection d'embryons de souris *in utero* par des cellules homologues permet une greffe de peau provenant des mêmes donneurs chez l'animal devenu adulte.

Par des méthodes immunologiques, BILLINGHAM en 1958⁴ a pu démontrer que la rate de ces souris tolérantes contenait des cellules lymphoïdes descendantes des cellules injectées *in utero* ou à la naissance.

La greffe de cellules érythroblastiques homologues par injection à la naissance chez la souris a été démontrée par MATHÉ, AMIEL et TRAN BA LOC en 1959^{5,6}.

BILLINGHAM et BRENT en 1956–57^{7,8}, SIMONSEN en 1957⁹, WOODRUFF et SPARROW en 1957¹⁰ ont montré que l'injection de cellules spléniques homologues adultes à des souris, rats ou poulets nouveau-nés entraînait un syndrome particulier caractérisé par un retard de croissance, un état cachectique aboutissant fréquemment à la mort dans les premiers mois de la vie; ils ont appelé ce syndrome «maladie des rabougris» (runt disease).

Ils ont pu rattacher la maladie des rabougris à une action immunologique des cellules injectées à la naissance contre leur hôte «tolérant» et montrer que la maladie des rabougris ne se produisait pas si les cellules homologues injectées à la naissance n'étaient pas «immunologiquement compétentes»¹¹.

Le problème essentiel posé par cette technique d'induction de tolérance est le devenir des cellules homologues greffées par injection intrafœtale ou par injection endo-veineuse à la naissance; selon l'origine tissulaire des cellules homologues greffées, la lignée dont elles proviennent, l'âge du donneur, quelles sont les conséquences possibles pour le receveur tolérant de ce greffon homologue?

Pour certains auteurs, des cellules hématopoïétiques prélevées sur des foies de fœtus de souris en état d'immaturité immunologique ne pourraient s'immuniser contre un hôte homologue et induire chez lui cette maladie cachectisante¹².

Nous nous sommes proposés dans le présent travail d'étudier la possibilité d'homogreffes par injection à la naissance, chez la souris, de cellules médullaires adultes ou de cellules hématopoïétiques embryonnaires, et leurs conséquences éventuelles sur le développement du receveur.

Ces notions peuvent avoir un intérêt clinique: de telles greffes de cellules érythropoïétiques normales adultes ou embryonnaires à la naissance pourraient être envisagées dans le cas d'hémoglobinopathies héréditaires.

Matériel et Méthodes. Les expériences ont été conduites sur des souris des lignées C₅₇Bl₆ (receveurs) et des souris DBA₂ (donneurs).

Les souris C₅₇Bl₆, âgées de moins de 8 h le plus souvent et toujours de moins de 24 h, reçoivent par voie veineuse, selon la technique décrite par BILLINGHAM et BRENT¹³ soit 5 · 10⁶ cellules médullaires de souris adultes DBA₂, soit 6 · 10⁶ cellules de foies embryonnaires prélevées sur des embryons de souris dans la semaine précédant la date présumée de leur naissance.

Un prélèvement sanguin est fait sur les souris C₅₇Bl₆ ainsi traitées à la naissance entre le 30^e et le 40^e jour de la vie, puis entre le 60^e et le 70^e, par ponction du sinus caveux.

Une solution d'hémoglobine est préparée à partir du sang obtenu selon la méthode de DRABKIN¹⁴; l'électrophorèse de cette solution d'hémoglobine est faite à travers un gel d'amidon selon la technique de SMITHIES¹⁵. Une électrophorèse d'hémoglobine de souris témoins DBA₂ et C₅₇Bl₆ est pratiquée simultanément. L'hémoglobine de la lignée C₅₇Bl₆ ne donne qu'une seule bande en électrophorèse alors que l'hémoglobine de la lignée DBA₂ se révèle par cette méthode être hétérogène¹⁶.

L'électrophorèse de mélanges d'hémoglobines C₅₇Bl₆ et DBA₂ a montré que cette dernière est décelable à partir d'un pourcentage dans le mélange compris entre 5 et 10%. La mise en évidence de plusieurs bandes sur électrophorèse de l'hémoglobine de souris C₅₇Bl₆ ayant reçu à la naissance une injection de cellules médullaires adultes ou hématopoïétiques embryonnaires DBA₂ est considérée comme la preuve de la greffe de ces cellules injectées (Fig. 1).

Résultats. A) Souris C₅₇Bl₆ recevant à la naissance 5 · 10⁶ cellules médullaires de donneurs DBA₂ adultes. 95 souris C₅₇Bl₆ ont été injectées à la naissance. 45 sont mortes dans les 48 h suivant l'injection. La suspension de cellules médullaires étant seulement filtrée sur coton et non lavée, sa nocivité immédiate est importante.

¹ R. D. OWEN, *Science* 102, 400 (1945).

² F. M. BURNET et F. FENNER, *The Production of Antibodies*, vol. 1 (MacMillan, Melbourne 1949).

³ R. E. BILLINGHAM, L. BRENT et P. B. MEDAWAR, *Nature* 172, 605 (1953).

⁴ R. E. BILLINGHAM, *Transpl. Bull.* 5, 80 (1958).

⁵ G. MATHÉ, J. L. AMIEL et TRAN BA LOC, *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.* 4, 475 (1959).

⁶ G. MATHÉ, J. L. AMIEL, TRAN BA LOC et J. BERNARD, *Journée Fr. Et. Clin. Biol.* mai 1959, analyse in *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.* 4, 506 (1959).

⁷ R. E. BILLINGHAM, in *La Biologie des Homogreffes*, vol. I (C.N. R.S.), Paris 1958, p. 183.

⁸ R. E. BILLINGHAM et L. BRENT, *Transpl. Bull.* 4, 67 (1957).

⁹ M. SIMONSEN, *Acta path. microbiol. scand.* 40, 480 (1957).

¹⁰ M. F. A. WOODRUFF et M. SPARROW, *Transpl. Bull.* 4, 157 (1957).

¹¹ P. B. MEDAWAR et M. F. A. WOODRUFF, *Immunology* 1, 27 (1958).

¹² D. D. UPHOFF, *J. nat. Cancer Inst.* 20, 625 (1958).

¹³ R. E. BILLINGHAM, L. BRENT et P. B. MEDAWAR, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 59, 409 (1955).

¹⁴ D. L. DRABKIN, *Arch. Biochem.* 21, 224 (1949).

¹⁵ O. SMITHIES, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).

¹⁶ J. ROSA, G. SCHAPIRA, J. C. DREYFUS, J. DE GROUCHY, G. MATHÉ et J. BERNARD, *Nature* 182, 947 (1958).

Parmi les 50 souris survivantes, 3 ont présenté une affection cachectisante correspondant parfaitement à la «maladie des rabougris» décrite par BILLINGHAM, BRENT et MEDAWAR^{7,8,13,17} et caractérisée par un arrêt de croissance, une perte de poids avec anorexie (Fig. 2), des lésions cutanées. Une de ces «maladies homologues», déclarée vers la deuxième semaine de la vie, a été régressive; les deux autres souris sont mortes, l'une le 14^e jour, l'autre le 24^e jour.

Ces deux souris présentaient une hypertrophie splénique avec prolifération cellulaire répondant à la description donnée par SIMONSEN¹, aucun indice histologique d'infection n'a été décelé.

L'hémoglobine de 47 souris a été étudiée à deux reprises entre le 30^e et le 40^e, puis entre le 60^e et le 70^e jour de la vie. Les résultats sont résumés dans le tableau I. L'hémoglobine d'une des trois souris ayant présenté une maladie cachectisante a pu être étudiée, son affection ayant régressé aux moments des prélèvements: elle a été négative.

B) Souris $C_{57}Bl_6$ recevant à la naissance $6 \cdot 10^6$ cellules hématopoïétiques prélevées sur foie embryonnaire DBA_2 . 74 souris ont été injectées à la naissance. 16 sont mortes dans les 48 h après l'injection.

Parmi les 58 souris survivantes à l'injection, 8 ont présenté une affection cachectisante (Fig. 3), 4 en sont mortes, respectivement les 13^e, 18^e et 46^e jour de la vie; 4 ont présenté des formes régressives, l'évolution de l'affection paraissant s'étagier sur plusieurs semaines; le poids et la taille de ces quatre souris survivantes sont restés cependant inférieurs à ceux de souris $C_{57}Bl_6$ du même âge. Les deux souris mortes les 13^e et 18^e jours présentaient une hypertrophie splénique avec prolifération cellulaire; celle morte au 46^e jour présentait au contraire une atrophie splénique, avec histologiquement une aplasie lymphoïde.

Les hémoglobines de 52 souris ont pu être étudiées à deux reprises entre le 30^e et le 40^e, puis entre le 60^e et le 70^e jour de la vie. Les résultats sont résumés dans le Tableau II.

Les hémoglobines de 5 des 8 souris ayant présenté une maladie cachectisante ont pu être étudiées: celles des 4 souris ayant présenté une forme régressive, avec 2 cas positifs et 2 cas négatifs, celle d'une souris à forme létale, qui a été négative.

Discussion. L'injection de cellules médullaires adultes ou hématopoïétiques embryonnaires prélevées sur foies de souris *in utero* peut réaliser la greffe de diverses lignées de cellules.

L'évolution de la greffe de cellules des lignées érythropoïétiques est appréciée par la mise en évidence de l'hémoglobine caractéristique de la lignée DBA_2 , démontrant ainsi l'existence d'érythrocytes circulants de type DBA_2 . Ces érythrocytes ne peuvent être ceux mélangés aux cellules injectées à la naissance; le nombre d'érythrocytes ainsi injectés, le délai écoulé avant les tests excluent cette hypothèse⁸.

La greffe de cellules immunologiquement compétentes peut être appréciée par la survenue de maladies cachectisantes chez les receveurs.

Dans le premier groupe recevant des cellules médullaires, la preuve de la greffe de cellules érythropoïétiques injectées à la naissance a pu être apportée dans 7 cas sur 47; dans le deuxième groupe, dans 11 cas sur 52; la différence de pourcentage des cas positifs dans les deux groupes n'est pas statistiquement significative.

Dans le premier groupe, 3 souris sur 50 étudiées ont présenté une maladie cachectisante, et 8 souris sur 58

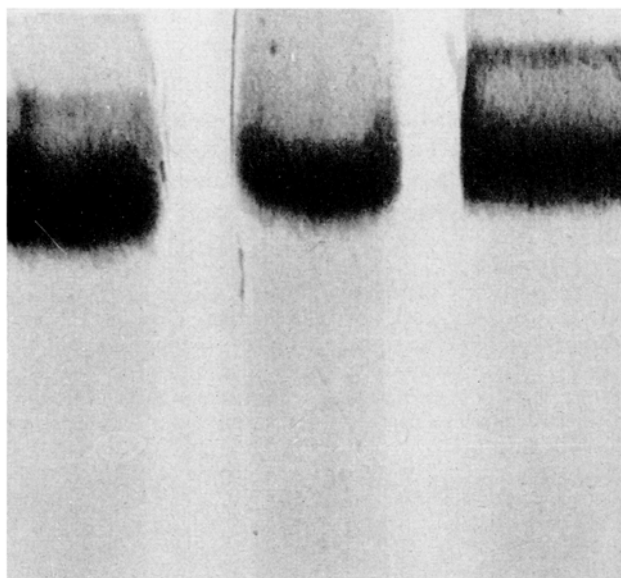


Fig. 1. Electrophorèses d'hémoglobine. A droite: hémoglobine de DBA_2 témoin; au centre: hémoglobine de $C_{57}Bl_6$ témoin; à gauche: hémoglobine de $C_{57}Bl_6$ injectée à la naissance avec de la moelle de DBA_2 .

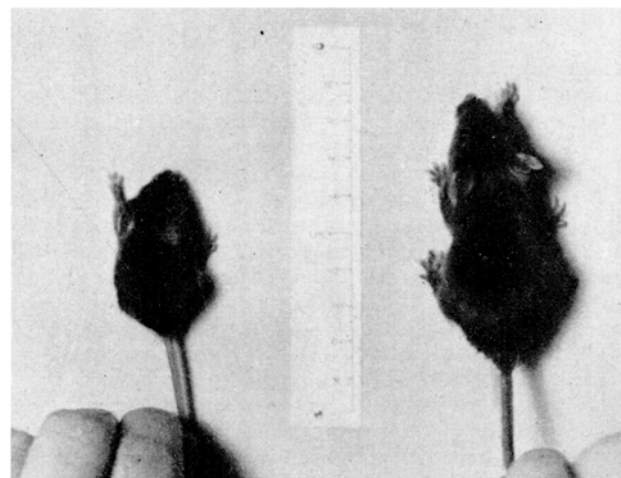


Fig. 2. Maladie homologue chez une $C_{57}Bl_6$ après injection de cellules médullaires adultes de DBA_2 à la naissance. A droite: souris témoin de 24 jours; à gauche: souris rabougrie du même âge. La souris rabougrie est morte 24 h après.

dans le deuxième groupe. Là encore, la différence des pourcentages n'est pas statistiquement significative.

Ces résultats apportent donc deux ordres de faits qui ne semblent pas avoir été observés jusqu'ici: a) la greffe de cellules érythropoïétiques homologues adultes ou fœtales à la naissance est possible chez la souris sans aucun conditionnement du receveur; b) l'injection de cellules médullaires, et non plus spléniques, homologues adultes, et l'injection de cellules hématopoïétiques homologues embryonnaires peuvent suffire à déclencher

¹⁷ G. MATHÉ et J. L. AMIEL, Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 5 20 (1960).

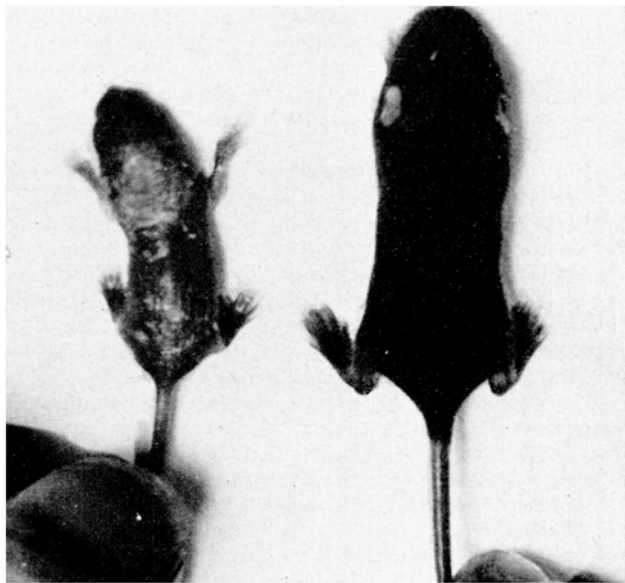


Fig. 3. Maladie homologue chez une C₅₇Bl₆ après injection de cellules hématopoïétiques embryonnaires de DBA₂ à la naissance. A droite: souris témoin de 13 jours; à gauche: souris rabougrie du même âge. La souris rabougrie est morte 6 h après.

Tab. I. Souris C₅₇Bl₆ recevant à la naissance des cellules hématopoïétiques de donneurs adultes DBA₂

Souris négatives au 1 ^{er} et au 2 ^e tests	Souris négatives au 1 ^{er} test et positives au 2 ^e test	Souris positives au 1 ^{er} test et négatives au 2 ^e test	Souris positives au 1 ^{er} et au 2 ^e tests
40	4	1	2

Tab. II. Souris C₅₇Bl₆ recevant à la naissance des cellules hématopoïétiques de donneurs embryonnaires DBA₂

Souris négatives au 1 ^{er} et au 2 ^e tests	Souris négatives au 1 ^{er} test et positives au 2 ^e test	Souris positives au 1 ^{er} test et négatives au 2 ^e test	Souris positives au 1 ^{er} et au 2 ^e tests
41	1	8	2

une maladie cachectisante, prouvant, dans les deux cas, la greffe de cellules immunologiquement compétentes homologues.

Il n'y a pas de relation obligatoire entre les succès et les échecs des greffes de ces deux lignées cellulaires, érythropoïétiques, et immunologiquement compétentes.

La possibilité d'induire chez la souris immunologiquement immature une maladie homologue par des cellules prélevées sur foie embryonnaire doit être soulignée. On a déjà observé des maladies secondaires chez des souris adultes irradiées et restaurées par des cellules érythropoïétiques homologues prélevées sur foies d'embryons^{18,19}. La possibilité d'une action homologue de cellules embryonnaires même chez un receveur nouveau-né n'avait pas encore été démontrée à notre connaissance.

Le petit nombre d'animaux examinés histologiquement (6 en tout) ne permet aucune conclusion sur l'aspect histologique du syndrome cachectisant induit par cellules médullaires ou de foies embryonnaires. On peut cependant noter que l'aplasie lymphoïde n'est observée que chez la souris morte au 46^e jour. Les souris mortes les 20 premiers jours présentaient, au contraire, une hypertrophie splénique avec prolifération cellulaire.

S'il existe bien une évolution en deux temps, l'aplasie lymphoïde pourrait s'interpréter comme le signe d'un réveil d'une activité immunologique de l'hôte, éliminant après une tolérance transitoire les cellules homologues greffées. Nos résultats montrant le passage d'une prolifération cellulaire lymphoïde à une aplasie totale chez des souris F₁ irradiées restaurées par de la moelle et des cellules ganglionnaires d'une lignée parentale¹⁷ nous conduisent à formuler l'hypothèse d'une action nocive spécifique des antigènes tissulaires de l'hôte tolérant sur les cellules lymphoïdes homologues immunologiquement compétentes du greffon, responsables de l'hypertrophie splénique primitive du receveur.

J. L. AMIEL et G. MATHÉ
Centre de Recherche sur les Leucémies et les Maladies du Sang, Association Claude-Bernard, Service Pr Jean Bernard, Hôpital Saint-Louis, Paris, le 24 juin 1960.

Summary

The endoveinous injection to newborn mice of homologous hematopoietic cells either adult or embryonic, may result in a lasting and functional graft.

The former statement can be demonstrated by use of starch gel electrophoresis which shows the specific hemoglobin of the donors.

In both uses this graft can induce a runt disease.

¹⁸ G. MATHÉ et J. BERNARD, Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 4, 442 (1959).
¹⁹ J. J. TRENTIN et T. M. DU WAYNE, Proc. Amer. Ass. Res. 3, 70 (1959).

PRO EXPERIMENTIS

A Simple Device
for Steady State Cultures of Microbes

In the course of investigations on yeast metabolism, the need arose for a simple apparatus for growing yeast cultures in a steady state. The following device has served us satisfactorily.

The feeding system (Fig. 1) is based on the principle of maintaining a constant head over a constant resistance. The constant head results from a constant level of the culture liquid in a small vessel (A) which is provided with an overflow outlet (B). The culture liquid is pumped up into this leveling vessel out of a storage tank (C), and the overflow spills down back into the storage tank. The resistance is determined by a glass capillary (D). A 1-mm bore glass capillary of 4 m length will give a resistance resulting in a flow rate of about 1 ml culture liquid/h/cm head. It is convenient to have the capillary in the form of a helix.