

localized in the descending branch of the first, high-molecular peak (Figure 1).

The pooled active fractions were again submitted to gel filtration on a comparable column, but at an ionic strength of 0.75 (*tris* buffered saline containing additional 0.6 M NaCl). This time, instead of 2, 3 peaks were obtained. The entire PF 4-activity was found in the 3rd peak (Figure 2). The higher salt concentration thus leads to a dissociation of a complex consisting of relatively low-molecular PF 4 and a high molecular carrier-material, to which the activity is bound at a physiological ionic strength.

The active fractions concentrated to a protein content (determined by the biuret method) of 0.6% neutralized 50 to 60 U of heparin per mg protein, as compared to 0.4 U/mg of homogenized platelets or 5–8 U/mg supernatant protein released by thrombin. The purification factors, based on a protein basis, thus range from 150 to about 10, depending upon the starting material. The difference to the much higher values given by DEUTSCH et al.<sup>3</sup> remains unexplained. Below an ionic strength of 0.3, purified PF 4 is only poorly soluble. It migrates, however, in disk electrophoresis at pH 2.9; a single band is thereby formed. In the ultracentrifuge (Spinco model E), a single peak with a sedimentation constant  $S_{20,w}$  of 2.6 is observed. The diffusion constant was found to be  $8.5 \times 10^{-7}$ . Assuming a partial specific volume of 0.725, a molecular weight of 29,000 can be calculated.

From peak 2 eluted from the biogel-column at high ionic strength (Figure 2), a material was obtained after removal of contaminant protein by precipitation at 15% (w/v)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  which was uniform in the ultracentrifuge ( $S_{20,w} = 2.8$ ); the diffusion coefficient was  $2.58 \times 10^{-7}$ . This material which is rich in carbohydrate appears to be the carrier of PF 4 at physiological ionic strength.

This was proven by recombination at 0.15  $\mu$ : a product which, on ultracentrifugation showed a single component was obtained on saturation of the carrier with PF 4; this recombined material is perfectly soluble and sediments with  $S_{20,w} = 12.1$ ; the diffusion constant is  $2.85 \times 10^{-7}$ . It should be noted that this fully saturated material is not identical with the released complex, which sediments much slower.

These experiments show that PF 4 is released from platelets by thrombin in the form of a complex of high molecular weight. At high ionic strength this complex dissociates into a carrier material and PF 4, the latter of a molecular weight of about 30,000. PF 4 thus obtained is poorly soluble below an ionic strength of 0.3  $\mu$ ; the carrier was also isolated and recombines with PF 4 at physiological salt concentration to a perfectly soluble complex.

*Zusammenfassung.* Der in Form eines hochmolekularen Komplexes von den Plättchen freigesetzte, Heparin-neutralisierende Faktor (PF 4) konnte reversibel in ein Träger-Material und ein aktives Protein (Molekulargewicht ca. 30 000) aufgespalten werden.

ROSMARIE KÄSER-GLANZMANN, MILICA JAKÁBOVÁ and E. F. LÜSCHER<sup>14</sup>

Theodor-Kocher-Institute,  
University of Berne, Freiestrasse 1,  
CH-3000 Bern (Switzerland), 2 May 1972.

<sup>14</sup> This work was supported by the 'Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung'.

## Modifications du nombre d'unités formatrices de colonies spléniques par des bactéries induisant l'immunostimulation non spécifique

L'introduction dans l'organisme de facteurs bactériens d'immunostimulation provoque de profondes modifications, telles l'hypertrophie hépato-splénique, l'augmentation non spécifique des immunoglobulines sériques<sup>1</sup>, parfois une lymphocytose<sup>2</sup> ou la stimulation des fonctions phagocytaires et lytiques du macrophage<sup>3,4</sup>. Les modifications du nombre d'unités formant des colonies spléniques (UFC) peuvent être considérées comme l'un de ces effets liés à l'introduction de l'adjuvant systémique. Ayant précédemment posé l'hypothèse d'une corrélation entre l'activité adjuvante de *Brucella* et l'enrichissement de l'organisme en cellules souches<sup>5</sup>, nous avons été amenés à étudier plus à fond ce phénomène.

Des souris femelles ( $C_{57} \text{Bl}_{6} \times \text{DBA}_{2}$ )  $F_1$ , âgées de 6 semaines ont reçu par voie intraveineuse différentes suspensions bactériennes connues pour leurs propriétés immunostimulantes: *Brucella abortus*, souche  $B_{19}$  inactivée ( $B_{19}$ ): 0,5 mg de poids sec par souris (aimablement fourni par le Professeur PILET, Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort); *Corynebacterium granulosum* inactivée (CG) ou Réticulostimuline: 0,5 mg par souris (aimablement fourni par le Professeur RAYNAUD, de l'Institut Pasteur); du *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) 'S' vivant de l'Institut Pasteur: 1 mg par souris.

A différents temps après l'injection des bactéries, la moëlle osseuse, le sang, la rate, ont été prélevés et le nombre d'UFC y a été déterminé selon la technique de TILL et MAC CULLOCH<sup>6</sup>. Les souris receveuses ont été

irradiées léthalement au béta-tron, par des électrons d'énergie 25 mev, à raison de 200 R/min, les animaux étant placés dans l'aire de l'isodose 95%. Le caractère élevé de la dose délivrée (1100 rads) s'explique en partie au moins par l'efficacité biologique relative plus basse que celle des rayons X.

Les résultats sont rapportés sur les Tableaux I, II et III. D'une façon générale, l'injection des bactéries tend à provoquer d'abord une diminution du nombre des UFC, puis une augmentation, mais cet aspect biphasique se présente différemment, selon la bactérie et l'organe considérés. On remarque en particulier, avec les deux bactéries inactivées, CG et  $B_{19}$ , que la diminution du nombre d'UFC est particulièrement sensible et rapide au niveau de la rate, puisqu'elle apparaît dès la 24ème h après l'injection. Elle est suivie, dès la 48ème h d'une augmentation qui persiste jusqu'au 15–20ème jour. Avec BCG, la chute initiale du nombre d'UFC est surtout évidente dans la moëlle et le sang. Ce n'est que le 13ème jour qu'apparaît

<sup>1</sup> J. H. HUMPHREY, Colloques du C.N.R.S. (1963), p. 401.

<sup>2</sup> S. I. MORSE, Nouv. Revue fr. Hémat. 8, 541 (1968).

<sup>3</sup> C. STIFFEL, D. MOUTON et G. BROZZI, Ann. Inst. Pasteur 120, 412 (1971).

<sup>4</sup> R. M. FAUVE et M. B. HEVIN, Ann. Inst. Pasteur 120, 399 (1971).

<sup>5</sup> L. TOUJAS, D. SABOLOVIC, L. DAZORD, Y. LE GARREC, J. P. TOUJAS, J. GUELFI et CH. PILET, Rev. Etud. clin. biol. 17, 267 (1972).

<sup>6</sup> J. E. TILL et E. A. MACCULLOCH, Radiation Res. 14, 213 (1961).

Tableau I. Nombre d'UFC dans la moëlle osseuse, la rate, le sang, après injection de *Brucella*

Jours après l'injection de <i>Brucella</i>	Nombre d'UFC par moëlle fémorale $\pm$ ES	Nombre d'UFC par rate $\pm$ ES <sup>a</sup>	Nombre d'UFC par ml de sang $\pm$ ES
Contrôles	1440 $\pm$ 245	1290 $\pm$ 168	20,5 $\pm$ 4,3
1	NT <sup>b</sup>	330 $\pm$ 48	NT
2	1286 $\pm$ 212	$\approx$ 2500	5,2 $\pm$ 0,87
4	2190 $\pm$ 243	> 4000	42 $\pm$ 2,1
10	2301 $\pm$ 368	> 4000	28,5 $\pm$ 3,4
20	3270 $\pm$ 270	$\approx$ 3000	NT

<sup>a</sup> Les imprécisions dans les chiffres sont dues à une trop grande abondance de colonies sur les rates. <sup>b</sup> NT, non testé.

Tableau II. Nombre d'UFC dans la moëlle osseuse et la rate après injection de *Corynebacterium granulosum*

Jours après l'injection <i>Corynebacterium granulosum</i>	Nombre d'UFC par moëlle fémorale $\pm$ ES	Nombre d'UFC par rate $\pm$ ES <sup>a</sup>
Contrôles	1590 $\pm$ 78	1168 $\pm$ 72
1	NT <sup>b</sup>	560 $\pm$ 68
2	1475 $\pm$ 30	2496 $\pm$ 148
5	1642 $\pm$ 31	> 4000
10	1110 $\pm$ 134	> 4000
15	1190 $\pm$ 113	2920 $\pm$ 248

<sup>a</sup> Les imprécisions dans les chiffres sont dues à une trop grande abondance de colonies sur les rates. <sup>b</sup> NT, non testé.

Tableau III. Nombre d'UFC dans la moëlle osseuse, la rate et le sang après injection de BCG vivant

Jours après l'injection de BCG	Nombre d'UFC par moëlle fémorale $\pm$ ES	Nombre d'UFC par rate $\pm$ ES <sup>a</sup>	Nombre d'UFC par ml de sang $\pm$ ES
Contrôles	1165 $\pm$ 168	856 $\pm$ 84	11,7 $\pm$ 1,6
1	NT <sup>b</sup>	1256 $\pm$ 96	NT
2	805 $\pm$ 70	NT <sup>b</sup>	11,1 $\pm$ 2,6
7	530 $\pm$ 130	864 $\pm$ 88	2,6 $\pm$ 1,6
13	615 $\pm$ 56	3080 $\pm$ 240	3,2 $\pm$ 0,7
20	1325 $\pm$ 83	> 3000	9,3 $\pm$ 2,7

<sup>a</sup> Les imprécisions dans les chiffres sont dues à une trop grande abondance de colonies sur les rates. <sup>b</sup> NT, non testé.

rait l'augmentation dans la rate. Cette augmentation du nombre des UFC dans la rate dépassant le triple de la valeur des témoins est un phénomène constamment observé avec les trois bactéries étudiées. Finalement il existe donc une tendance à l'enrichissement de l'organisme en cellules jeunes, en particulier, à la périphérie, au niveau de la rate.

Ces observations peuvent être interprétées en suggérant que les bactéries adjuvantes ont provoqué la différenciation des cellules souches – ce que traduit la chute initiale des UFC, puis leur multiplication compensatrice. Il se peut aussi qu'une migration de cellules souches ait participé à la constitution du capital splénique<sup>7</sup>.

Il est difficile de préciser quelles relations existent entre ces phénomènes et l'immunostimulation non spécifique induite par les bactéries. L'action de certains adjuvants systémiques semble s'exercer essentiellement par l'intermédiaire des cellules dérivées de la moëlle osseuse<sup>8,9</sup>. Il est possible que l'accélération de la différenciation des cellules souches, puis leur accroissement numérique aient contribué à augmenter la disponibilité en cellules immunocompétentes, en monocytes et en précurseurs lymphoïdes non engagés.

**Zusammenfassung.** Das Verhalten hämopoietischer Stammzellen in Knochenmark, Milz und peripherem Blut der Maus nach Injektion von *Brucella abortus*, *Corynebacterium granulosum* oder *Bacillus-Calmette-Guérin* wird beschrieben.

L. TOUJAS, L. DAZORD, Y. LE GARREC<sup>10</sup>  
et D. SABOLVIC<sup>10</sup>

Centre Anticancéreux Eugène Marquis, Pontchaillou, F-35-Rennes (France); et Laboratoire de Bactériologie et Immunologie, École Nationale Vétérinaire, F-93 Maisons-Alfort (France), 10 mars 1972.

<sup>7</sup> M. BENNET et G. CUDCOWICZ, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 129, 99 (1968).

<sup>8</sup> H. FINGER, P. EMMERLING et E. BRUSS, Infect. Immun. 7, 251 (1970).

<sup>9</sup> P. A. CAMPBELL et P. KIND, J. Immun. 107, 1419 (1971).

<sup>10</sup> Laboratoire de Bactériologie Immunologie, Ecole Nationale Vétérinaire, 93 Maisons-Alfort.