

sera to 1:4 usually lost the activity for induction of congestions and hemorrhages, although the P activity was not affected.

Results obtained on the properties of P factor were summarized in table 2. Heating sera at 56 °C for 30 min abolished the activity, but no significant effect was obtained in heating sera at 45 °C for 30 min. Dialysis of the serum did not remove the activity. To discover whether the factor had affinity to cell surface membrane, absorption experiments were performed. The activity was completely removed by kidney cells and erythrocytes at 37 °C, but not significantly at 0 °C or 25 °C. Spleen cells also removed the activity significantly, but not completely at 37 °C. Heterophile antibodies to guinea-pig cells were removed by these absorptions, as reported by other researchers⁴. Treatment of sera with 2-ME abolished the activity at a final concentration of 0.1 M. Diphenhydramin-HCl and SBTI had no effect on the activity, which was in agreement with the results obtained by Edler and Wilhelm¹. Fractionation of the serum through Sephadex G 200 showed that the activity was demonstrated mainly in 19 S fraction. As seen in table 2, comparisons of the properties between the P and N factor obtained in our laboratory, and from the literature¹⁻⁹, indicated that these 2 factors were almost similar. Such results were speculated already by Edler et al.¹ and Klemperer et al.⁶. However, no attempts to prove the relationship between these had been performed. Time course studies revealed that these 2 factors acted in the different phases; the P factor acted in the early stage and

the N factor acted in the later stage. Whenever the P activity was removed or abolished by the pretreatments, no N activity was observed. Therefore, it seemed to be plausible that the P factor of PF/Nat played as an initiator followed by the activation of some unknown factors to develop to skin necrosis.

The long-lasting permeability factor in sera of some patients with IgG monoclonal gammopathy was previously reported¹⁰, and it was easily distinguished from PF/Nat by its long-lasting activity, resistance to heating at 56 °C and belonging to the IgG fraction.

* Acknowledgment. The authors wish to thank Prof. H. Hayashi, Kumamoto University for encouragement and discussions.

- 1 J.M. Edler and D.L. Wilhelm, Br. J. exp. Path. 19, 335 (1958).
- 2 F. Küster, Klin. Wschr. 30, 999 (1952).
- 3 R.R.H. Lovell, D.M. Pryce and W.C. Boake, Br. J. exp. Path. 35, 345 (1954).
- 4 W.C. Boake and R.R.H. Lovell, Br. J. exp. Path. 35, 350 (1954).
- 5 Y. Mizushima, R. Kasukawa and Y. Oshima, Acta rheum. scand. 8, 183 (1961).
- 6 F. Klemperer, R. Fried and K. Stark, Br. J. exp. Path. 43, 116 (1962).
- 7 R. Kasukawa, Ryumachi 5, 1 (1963).
- 8 R.W. Moskowitz, J. Lab. clin. Med. 66, 927 (1965).
- 9 M. Sato, H. Yoshida, R. Kasukawa and T. Yoshida, Ryumachi 17, 174 (1977).
- 10 H. Yoshida, R. Kasukawa, T. Yoshida and K. Kano, Int. Archs Allergy 45, 620 (1973).

Etude comparative de l'effet de la thymosine et d'un extrait de cultures cellulaires épithéliales thymiques sur la production d'anticorps

Comparative study of the effect of thymosin and supernatant from epithelial thymic cells on antibody production

P. Deschaux¹, R. Fontanges et A. Goldstein²

Laboratoire de Physiologie cellulaire, Université Claude Bernard, F-69621 Villeurbanne (France), et Division of Biochemistry, University of Texas Medical Branch, Galveston (Texas 77550, USA), 6 juillet 1978

Summary. A thymic extract (TE) was prepared from supernatant of mice thymic epithelial cultures according to the purification of thymosin. TE and thymosin stimulated, in vitro, the immune response of mouse against sheep red blood cells.

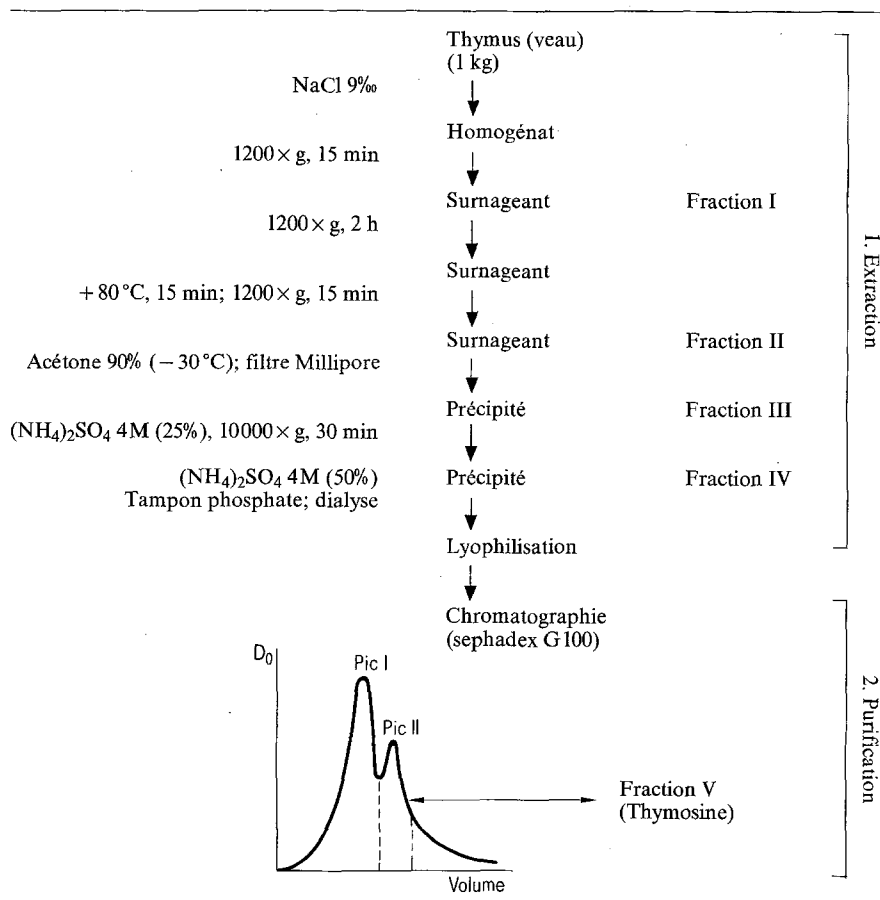
Les cellules thymiques épithéliales sont généralement considérées comme la source des facteurs de différenciation des cellules souches hématopoïétiques en lymphocytes T. Cependant, la relation entre ces facteurs et des extraits de cultures cellulaires épithéliales reste imprécise.

Dans notre travail nous avons comparé le pouvoir de stimulation sur la production d'anticorps, in vitro et in vivo, de ces extraits et de la thymosine. Les extraits ont été préparés à partir de surnageants de cultures cellulaires épithéliales selon la technique employée pour l'isolement de la thymosine.

Matériels et méthodes. Cultures de cellules épithéliales thymiques. Les thymus prélevés sur des souris mâles Swiss âgées de 30 jours sont traités par la collagénase (0,05%) puis par la trypsine (0,25%)³. Les fragments thymiques, débarrassés des lymphocytes, sont répartis à la surface de flacon de culture (Flacon Falcon, 30 ml) avec une fine pellicule de milieu de culture (milieu 199 + 10% de sérum de veau). Ce milieu est remplacé au bout de 48 h. Après 4 jours de culture nous observons un tapis cellulaire complet; nous remplaçons le milieu nutritif. Après 8 jours de culture à +37 °C nous raclons délicatement le fond du flacon; le

milieu contenant les cellules en suspension est alors centrifugé (700×g; 15 min), le surnageant est prélevé pour l'extraction et le culot contenant les cellules épithéliales est utilisé pour la vérification de la structure des cellules en microscopie électronique. Parallèlement aux cultures cellulaires épithéliales thymiques, nous réalisons dans les mêmes conditions des cultures de cellules de rein de souris. Vérification de la structure cellulaire épithéliale en microscopie électronique. Le culot obtenu comme il a été décrit précédemment est traité pour l'étude en microscopie électronique (solution de glutaraldéhyde : acide osmique : résine). Après solidification, les coupes, faites à l'ultramicrotome Reichert, sont étudiées au microscope Siemens Elmiskop 1 A.

Préparation des extraits. Nous avons utilisé des thymus de veau; l'extraction et la purification de la thymosine sont faites selon la technique de Goldstein et coll.⁴⁻⁶ résumée sur le tableau. La préparation des extraits à partir de surnageants de cultures cellulaires épithéliales thymiques est faite selon cette même technique. Le surnageant obtenu après centrifugation du milieu de culture est considéré comme la fraction I du tableau et nous permet d'obtenir

Extraction de la thymosine selon Goldstein et coll.^{7,9,11}.

l'extrait I. Nous avons procédé de la même façon à partir des surnageants de cultures cellulaires de rein (extrait II) et du milieu de culture initial avant utilisation (extrait III).

Etude de la production d'anticorps *in vivo*. a) Préparation des animaux. Nous utilisons des souris Swiss mâles âgées de 2 mois. 5 jours avant le sacrifice, les animaux reçoivent par injection i.p. 0,25 ml d'une suspension (11%) de globules rouges de mouton; un lot d'animaux recevra uniquement 0,25 ml d'une solution saline physiologique. Les animaux ayant reçu la suspension d'hématies sont répartis en lots de 5 animaux. Le lot I (témoin) reçoit 0,25 ml par i.p. d'une solution physiologique durant 4 jours, les lots II, III, IV, V recevront dans les mêmes conditions:

Lot II: 0,25 ml de thymosine, fraction V (100 µg/ml par i.p.),

lot III: 0,25 ml extrait I (100 µg/ml par i.p.),

lot IV: 0,25 ml extrait II (100 µg/ml par i.p.),

lot V: 0,25 ml extrait III (100 µg/ml par i.p.).

b) Détermination du nombre de Plaque Forming Cells (PFC). Le 5^e jour les animaux sont sacrifiés par fracture cervicale, la rate prélevée et le nombre de PFC déterminé selon la technique de Mishell et Dutton⁷.

Etude de la production d'anticorps *in vitro*. Nous utilisons des souris Swiss mâles âgées de 2 mois.

a) Préparation des suspensions cellulaires. Les rates sont prélevées stérilement à partir de souris intactes; ces organes sont dispersés dans du milieu froid F₁₄. Les cellules sont ensuite dissociées et centrifugées à 4 °C (900 × g; 10 min).

b) Conditions de culture. Les cellules spléniques (1 ml) sont réalisées dans du milieu 199 (+ 10% de sérum de veau) selon les conditions décrites par Mishell et Dutton⁷. Des globules rouges de mouton sont utilisés comme antigène à

raison de 3×10^6 globules pour $1,5 \times 10^7$ lymphocytes. Les cultures témoins reçoivent 0,05 ml de solution physiologique (solvant de la thymosine et des extraits testés); la thymosine et les extraits sont additionnés à raison de 100 µg/ml. La viabilité est déterminée en employant une solution de bleu trypan (0,05%).

Résultats et discussion. Nature des cultures de cellules épithéliales thymiques. Les caractéristiques de cellules épithéliales thymiques décrites *in vivo* sont retrouvées: présence de desmosomes et de tonofilaments; certaines possèdent fréquemment des vacuoles qui contiennent un matériel dense aux électrons. De plus, ces cellules possèdent un ergastoplasme et un noyau dilaté (figure 3).

Effet de la thymosine et des surnageants de culture sur la production d'anticorps. L'extrait préparé à partir du milieu de culture de cellules épithéliales thymiques (extrait I) montre un effet stimulateur comparable à celui obtenu avec la thymosine fraction V (figure 1, a). Nous n'obtenons aucune action ni stimulatrice, ni inhibitrice avec les extraits II et III. La figure 1, b, montre qu'il y a également une stimulation lorsque nous rapportons le nombre de PFC à 10^6 cellules vivantes. Nous n'obtenons pas de multiplication lymphocytaire (figure 1, c).

Nous avons rapporté sur la figure 2 le nombre de PFC obtenu pour 10^6 lymphocytes *in vitro*. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vivo*. L'extrait I stimule la production de PFC dans la même proportion que la thymosine. Les mécanismes intimes de la différenciation des cellules souches lymphoïdes sous l'influence du thymus sont encore mal connus. Qu'il s'agisse de maturation intra- ou extrathymique l'intervention d'une hormone thymique fut sus-

pectée dès qu'on découvrit le rôle central du thymus dans l'immunité à médiation cellulaire⁸. L'origine épithéliale de ces facteurs thymiques a été soupçonnée depuis les expériences d'Osoba et Miller⁹ qui greffèrent à des souris thymectomisées à la naissance un thymus placé dans une chambre millipore laissant passer les substances solubles mais imperméable aux cellules. Il n'a jamais été établi de relation entre des sécrétions *in vitro* de cellules épithéliales et les facteurs de différenciation;

cependant des travaux rapportent l'effet d'extraits thymiques cellulaires épithéliaux sur différents phénomènes immunitaires¹⁰. Parmi les facteurs thymiques, la place fondamentale de la thymosine d'Allan Goldstein et coll.⁴⁻⁶ a été démontrée d'une part, en immunologie¹¹, d'autre part, en endocrinologie générale¹².

Nous avons préparé un extrait à partir de surnageant de cultures cellulaires épithéliales selon la même technique que celle utilisée pour l'extraction de la thymosine. Cet extrait reproduit l'effet de stimulation antigénique de cette dernière hormone (augmentation du nombre de PFC). Les mécanismes d'action de la thymosine et de l'extrait semblent être les mêmes, se situant non pas au niveau de la multiplication des lymphocytes mais au niveau intracellulaire. Dans un travail précédent il a été montré une augmentation du taux de GMP cyclique dans les pré-thymocytes se différenciant en présence de thymosine¹³. L'étude d'un mécanisme intralymphocitaire du même type que pour les thymocytes est en cours. Il semble donc qu'à partir de cellules épithéliales thymiques en culture et par le même procédé d'extraction, nous puissions obtenir un produit ayant les effets de la thymosine.

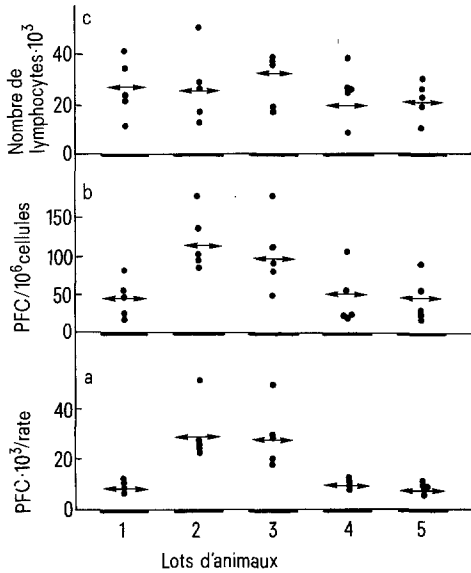


Fig. 1. Nombre de PFC obtenu après stimulation antigénique *in vivo*. Les animaux du lot I reçoivent par i.p. 0,25 ml ($\times 4$ jours) d'une solution saline physiologique, les lots II, III, IV et V reçoivent dans les mêmes conditions 0,25 ml soit de thymosine (lot II), soit d'extrait de surnageant de cultures cellulaires épithéliales thymiques (lot III) d'extrait de surnageant de cultures de rein de souris (lot IV), d'extrait de milieu de culture original (lot V). Chaque point représente le résultat d'une expérience comprenant 5 animaux. Les résultats sont exprimés en PFC/rate (a), PFC/ 10^6 lymphocytes (b), c: nombre de lymphocytes par rate.

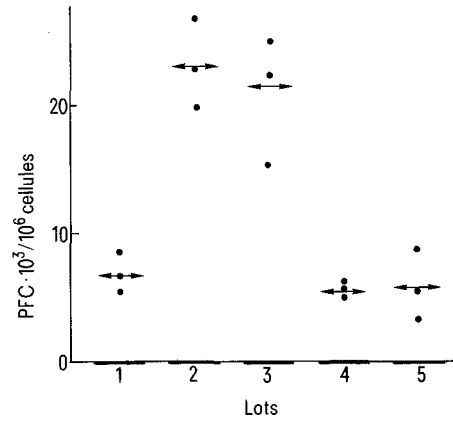


Fig. 2. Nombre de PFC obtenu après stimulation antigénique *in vitro*. Les résultats sont exprimés pour 10^6 cellules viables.

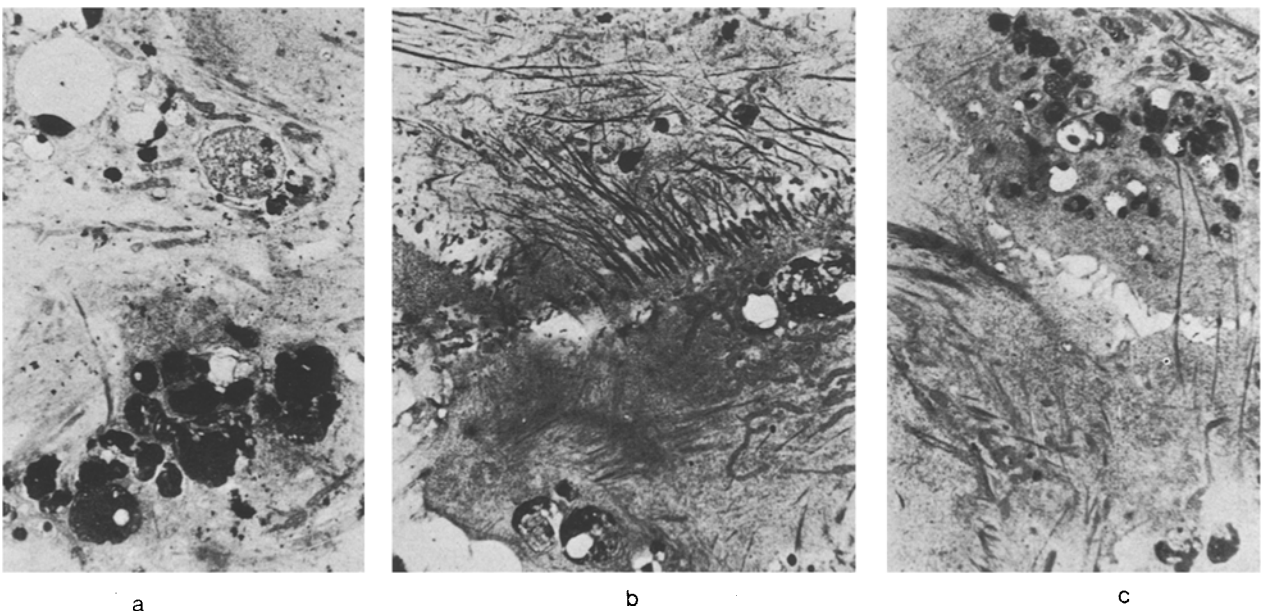


Fig. 3. Cellules épithéliales thymiques en culture. $\times 25000$. a: Présence de vacuoles. b: Présence de desmosomes. c: Présence de tonofilaments.

1 Assistant visiting Professor of University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas.

2 Les auteurs remercient Mademoiselle Condemine Florence pour son aide technique durant ce travail.

3 S.D. Waksal, I.R. Cohen, J.W. Waksal et W.F. Scherle, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249, 492 (1975).

4 A.L. Goldstein, F.D. Slater et A. White, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 56, 1010 (1966).

5 A.L. Goldstein, A. Guma, M. Katz, M. Hardy et A. White, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 69, 1800 (1972).

6 J.A. Hooper, M.C. McDaniel, G.B. Thurman, R.S. Schulof et A. White, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249, 125 (1975).

7 R. Mishell et R. Dutton, *J. exp. Med.* 126, 423 (1967).

8 J.F.A.P. Miller, *Lancet* 2, 748 (1961).

9 D. Osoba et J.F.A.P. Miller, *J. exp. Med.* 119, 177 (1964).

10 A.M. Kruisbeek, T. Krose et J. Zijlstra, *Eur. J. Immun.* 7, 375 (1977).

11 A.L. Goldstein, *Trans. Am. clin. Ass.* 88, 79 (1976).

12 P. Deschaux et R. Fontanges, *Ann. Endocr., Paris* 39, 23 (1978).

13 P.H. Naylor, H. Sheppard, G.B. Thurman et A.L. Goldstein, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 73, 843 (1976).

Catecholamines in adult iron deficiency patients¹

A. Wagner, N. Fortier, A. Giroux, J. Lukes and L.M. Snyder²

Department of Hematology, St. Vincent Hospital and Community and Family Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester (Massachusetts 01604, USA), 18 September 1978

Summary. Patients with iron deficiency whether uncomplicated or associated with other types of anemias, had plasma catecholamine levels which were significantly increased above normal controls. Patients with a variety of other anemias had no significant increase in catecholamine levels. Plasma catecholamine levels in uncomplicated iron deficient patients approached normal values as early as 3 h following oral FeSO₄.

Catecholamines are thought to play a role in influencing human behavior, subsequently, any increase in catecholamines may contribute to determining behavioral symptoms such as are manifested by iron deficient patients, i.e., irritability, inattention, and decreased ability to concentrate.

The relationship between catecholamines and iron deficiency has recently been explored. Voorhess et al.³ noted that urinary excretion of norepinephrine was elevated in children with iron deficiency. Therefore, we felt it appropriate to investigate plasma catecholamine levels in adult patients with various types of anemias. In the present study, we report that patients with iron deficiency, whether uncomplicated or associated with other anemias, had plasma catecholamine levels that were significantly increased above normal controls. However, patients with a variety of other anemias had no significant increase in catecholamine levels.

Patients selected with iron deficiency were required to demonstrate morphological changes, i.e., hypochromasia, microcytosis, decreased serum iron, increased iron binding capacity, and absent bone marrow iron as determined by Prussian blue stain. Additionally, an increase in hematocrit following oral iron therapy was noted. Patients with iron deficiency co-existing with other diseases were diagnosed by the absence of bone marrow iron. Patients with other types of anemias, such as chronic simple anemia, hemolytic anemias, Thalassemia minor, had normal bone marrow iron stores. Epinephrine and norepinephrine were determined employing a fluorometric procedure by Haggendal⁴ with certain modifications: 1. sodium thiosulfate was used as an antioxidant, and 2. dithiothreitol as a stabilizer. Plasma catecholamines were expressed as µg/l.

Table 1 demonstrated the serum iron, binding capacity and catecholamine levels in various anemias studied. Uncomplicated iron deficiency patients had a mean value of

Table 1. Serum iron, iron binding capacity, and plasma catecholamine values in anemia

Number Patients and diseases		Catecholamines µg/l		Iron (µg/dl)	Total iron binding capacity (µg/dl)
		Norepinephrine	Epinephrine		
10	Normal	0.5 ± 0.5	0.3 ± 2.0	120 ± 60	340 ± 80
14	Fe deficient	2.35 ± 1.56	2.55 ± 1.76	42 ± 29	388 ± 80
11	Fe deficient (with other disease)	3.80 ± 2.21	2.80 ± 1.97	54 ± 44	299 ± 72
13	Other anemias	1.53 ± 1.36	0.91 ± 1.00	82 ± 41	297 ± 70

Units expressed as ± 1 SD.

Table 2. Plasma catecholamine levels before and after treatment with 600 mg of ferrous sulfate

Iron deficient patients	Catecholamines (before treatment)		Catecholamines (after treatment)	
	Norepinephrine (µg/l)	Epinephrine (µg/l)	Norepinephrine (µg/l)	Epinephrine (µg/l)
1	2.1	5.2	0.4	1.9*
2	5.1	3.3	1.5	0.7**
3	1.2	0.9	0.0	0.3***
4	2.3	1.6	0.6	0.2***
5	3.0	5.1	0.6	0.0***
6	1.9	1.1	0.8	0.3*

* 3 h post-treatment; ** 24 h post-treatment; *** 72 h post-treatment.