

ALLOGENEIC BONE MARROW GRAFTS IN GENOTYPED SWINE

VAILLAN M., ARNOUX B., DABURON F.; HAAG J.

Previous evidence was given of satisfactory bone marrow autografting in the swine (1). The proof of a major histocompatibility complex(LHC) called SL-A (2) enabled us to promote bone marrow (b.m.) allografts. Beside our concern in radiobiology, a study of the response to that kind of graft in the pig was interesting, considering its specific reaction against orthotopical liver allotransplantations(3,4).

MATERIALS & METHODS.

Allografts were made between siblings of LARGE WHITE breed or LARGE WHITE x LANDRACE cross breed. The typing was carried out with our lymphocytotoxic (2) and mixed lymphocyte reaction (MLR) (5) routine techniques. Pairs being matched for A blood group. All pairs but two were chosen of both sexes to check the marrow engraftment by cytogenetic technique. After a three week quarantine the animals were injected daily i.m. doses of Penicillin (1 million I.U.) and Streptomycin (1 g.) from day 8 to day 3 before exposure to radiations. At the time of irradiation the pigs were 4.5 to 5.5 months old and weighed 40 to 50 kg. The recipients were given whole-body irradiation provided by eight opposite ⁶⁰Co sources, at dose-rates ranging from 52 to 40 rads per min. (midline-tissue absorbed dose) (1). This study includes four groups of animals :

- 1 -4 irradiated ungrafted controls(2 at 800 rads,2 at 1000 rads)
- 2 -3 irradiated swine at 1000 rads and autografted with fresh b.m. just after exposure.
- 3- 8 irradiated animals(7 at 950 rads, 1 at 1050 rads) and injected with SL-A incompatible b.m.
- 4- 8 irradiated animals at 950 rads and injected with SL-A identical b.m. each time serological and MLR tests were concordant. It is worth recalling that in swine a 950 rads dose is higher than 1.5 LD 100% / 15 days (6).

After a 20 hours fasting the allogeneic recipient was irradiated re-trained awake in a hammock. After the donor was killed, b.m. was aseptically prepared from the active areas of the long bones, sternum, illium and scapula and was suspended into heparinized 199 TC medium (1 mg in 5 ml). The cell-aggregates were dissociated by numerous passages through a fine needle and the nucleated cells counted. 150 to 300 ml of the b.m. suspension were injected i.v. 20 hours or so after exposure, i.e. 5 hours after the donor was killed. Each recipient was housed in a self-contained unit.

The irradiated animals were given continuous i.v. balanced hydrous, electrolytic and caloric supplies, as long as they did not feed by themselves. Regular antibiotherapy (Kanamycin : 1 g. , Penicillin : 1 million I.U.) was carried out for 8-to 10 days. When needed, fresh platelets were transfused. Blood tests were performed twice or three times a week for the first three weeks, then once a week. No immunosuppressive therapy was given.

RESULTS - The results are summarized in Table 1

The ungrafted swine survived till day 8. Even at much lower doses, such as 400 or 500 rads, spontaneous survival was never observed. Bone marrow autografts at an average dose of 10^8 nucleated cells per kg ensured hematological recovery in the treated animals. Two of them died of lung infection at day 57 and day 203 , respectively. This delayed mortality could be ascribed to a defect in defence mechanisms plus possible radiation-induced alterations in the lungs.

All the incompatibly allografted pigs died of hematological syndrome within time-limits equal to those of the controls. None but one, showed a slight increase in the white blood cell count. In most cases, the bone marrow was entirely depleted. However, several animals showed a histio-reticular reaction , held up as evidence of a host-vs-graft rejection. Seven compatibly allografted swine outlived their hematological syndrome almost uneventful. The last animal died of broncho-pneumonia, on day 6, with conspicuous signs of bone marrow recovery. Developments of the peripheric leukocyte in this group and in the autologous group are plotted in fig. 1.

The developments were almost similar during the first month. Then a relative fall occured in the allografted group ; which fall was found non-significant for want of more data.

The blood lymphocyte caryotypes, were always of donor origin.

Clinically speaking, after an early stage of about a month, similar to that observed in the autografted pigs, health of the allografts has been impairing more or less rapidly. A progressive loss of weight was observed,

related or not either to anorexia or any other digestive disorder. They all died in a state of cachexia. Some of them had lung infection, whereas others showed no conspicuous lesions. Sometimes post mortem examination displayed gross inflammatory oedema in various segments of the small intestine.

DISCUSSION

Though still preliminary, these data state a number of interesting points :

- 1 - Bone marrow allografting complies with the rule of tissular compatibility with the MHC. It reacts the same way as skin, kidney and small intestine grafts, tested in this species (7).
- 2 - The taking of SL-A incompatible bone marrow allografts could not be achieved under the experimental conditions we had faced. In spite of the high doses of radiation, recipients were capable of rejecting their grafts, regularly.

As a matter of fact, this result was unexpected, and deviates from data obtained in other species, such as dog (8,9), and monkey (10).

However higher doses of radiation are out of the question since we reach the threshold dose of the gastro-intestinal syndrome (11).

- 3 - SL-A identity ensured 100% initial achievement. However animals developed regular fatal disease within a fairly short time. This development could by no means, be ascribed to the sole sequelae of radiation sickness since autografted animals at equal or even higher doses, showed none of the symptoms.

Assumption of a chronic graft-vs-host reaction (GVHR), induced by the minor histocompatibility systems, was put forward, but should be confirmed histopathologically. The animals often, showed but short spells of diarrhoea. On the other hand, jaundice and specific skin lesions were not observed (9,12). Wasting and at times pneumonia being in fact the main manifestations of the disease.

Studies on the presumed GVH and the ways in which the disease might be prevented or overcome will constitute the next step in our programme.

TABLEAU 1

SURVIVAL OF LETHALLY IRRADIATED PIGS
EITHER WITH OR WITHOUT TREATMENT.

Grafts	Nb of animals	Injected b m c $\times 10^9$ / kg.	Individual survival times (days)	Mean survival (days)
-	4	-	7,7 ; 9. 9.	8,0
Autologous	3 ^a	0,1	57 ; 203 ; > 360	>200
SL-A non identical	8	0,8	5 ^c ; 6 ^c ; 6. 7. 8. 8 ^c ; 9 ^b ; 12.	7,6)
SL-A identical	8	0,9	6; 20 ; 26; 28; 38 ; 54 ; 57 ; 110	42,3(

(p < 0.002^d)

a - irradiation dose : 1000 rads.

b - animal irradiated at 1050 rads with all others at 950 rads.

c - One haplotype incompatible grafts.

d - MANN WHITNEY TEST.

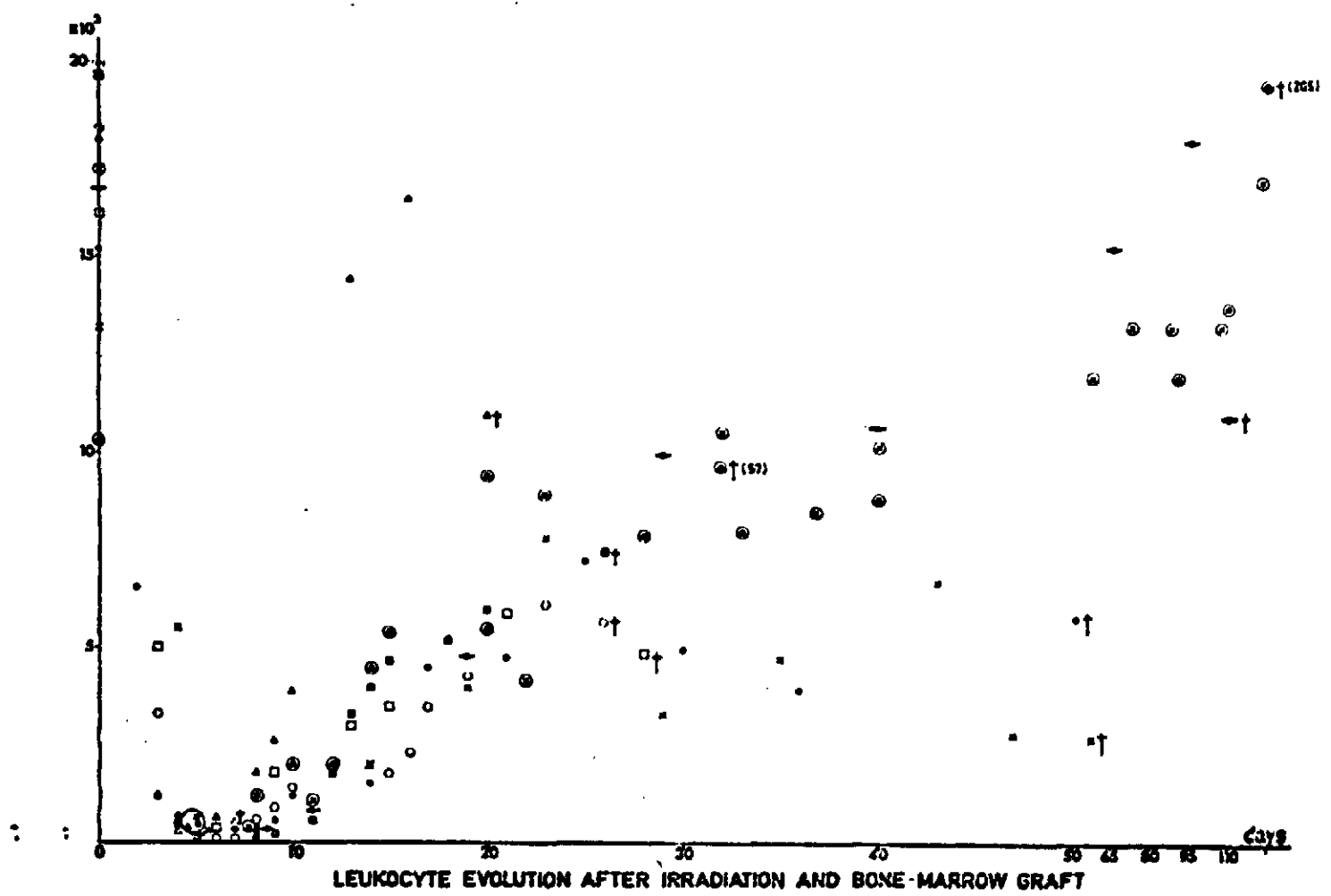


FIGURE 1

INDIVIDUAL EVOLUTIONS WITH TIME OF THE BLOOD LEUKOCYTE
IN PIGS EXPOSED TO LETHAL IRRADIATION AND HAVING RECEIVED
EITHER AUTOLOGOUS OR SL - A IDENTICAL ALLOGENEIC BONE
Marrow GRAFTS.

† : animals dead or sacrificed.

The circled symbols represent autografts and the uncircled symbols
represent allografts.

REFERENCES

- 1 - VAIMAN, M.; DUBIEZ, R.; COLSON, X.; NIZZA, P.
Autogreffes de moelle osseuse chez des porcs irradiés à doses létales.
Int. J. Radiat. Biol. 1968 , 14 , 207.
- 2 - VAIMAN, M.; RENARD, Ch. ; LAPAGE, J.; AMETEAU, J.; NIZZA, P.
Evidence for a histocompatibility system in swine (SL-A).
Transplantation ,1970 , 10 , 155.
- 3 - CALNE, R.Y.; SELLS, R.A.; FENA, J.R.; DAVIS, D.R.; WILLARD, P.R.;
HERBERTSON, B.M.; BINNS, R.M. ; DAVIES, D.A.L.
Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts.
Nature ,1969, 223 , 472.
- 4 - CHOMETTE, G. ; GARNIER, H.; CLOT, J.-P. ; PINAUDEAU, Y. ; AURIOL, M.;
BROCHERIOU, C.
L'homotransplantation hépatique chez le porc (étude morphologique).
Ann. Anat. Path. 1969 , 14 , 151.
- 5 - VAIMAN, M. ; ANNOUX, A. ; FILLEUL, X. ; NIZZA, P.
Le système d'histocompatibilité SL-A du porc : étude par la technique
des cultures mixtes de leucocytes.
C.R. Acad. Sc. Paris , 1970 , 271 , 1724.
- 6 - CHAMBERS, F.W. ; BILES, C.R. ; BODENLOS, L.J. ; DOWLING, J.H.
Mortality and clinical signs in swine exposed to total-body Cobalt 60
gamma irradiation
Radiation Res. 1964, 22 , 316.
- 7 - VAIMAN, M. ;
Le complexe d'histocompatibilité majeur SL-A du porc. Mise en évidence-
Etude - Rôle dans les allogreffes.
Thèse Doctorat es-Sciences 1973. Fac. Sciences. Paris.
- 8 - DALE, D.C. ; GRAW, R.G.
Transplantation of allogeneic bone marrow in canine cyclic neutropenia.
Science , 1974 , 183 , 83.
- 9 - STORB, R. ; HUDOLPH, R.H. ; THOMAS, E.D.
Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed
leukocyte culture .
J. of Clinical Investigation ,1971, 50 , 1272.
- 10 - CROUCH, B.G.; Van PUTTEN, L.M.; Van BEKKUM, D.W.; de VRIES, M.J.
Treatment of total body X-irradiated monkeys with autologous and
homologous bone marrow.
J. Nat. Cancer Invest. ,1961 , 27 , 53.
- 11 - JONES, S.R. ; GEORGE, R.E. ; WEST, J.E. ; VERRELLI, D.M.
The relative effectiveness of fission neutrons for gastrointestinal
death in miniature pigs.
Rad. Res.,1972, 50 , 504.
- 12 - Van BEKKUM, D.W. ; de VRIES, M.J.
Pathology of the radiation chimera. In Radiation chimaeras.
Logos Press Ltd. London. 1967 , p. 127

ALLOGENEIC BONE MARROW GRAFTS IN GENOTYPED SWINE

VAJMAN M.

INTRODUCTION

Nous avons montré antérieurement la possibilité de réaliser dans des conditions satisfaisantes des autogreffes de moelle osseuse chez le porc (1) . La démonstration dans cette espèce d'un complexe d'histocompatibilité majeur SL-A (2) nous a permis de développer le programme sur les allogreffes de moelle osseuse. Indépendamment des préoccupations dans le domaine de la radiobiologie, il était intéressant d'étudier les réactions du porc vis-à-vis de ce type de greffe étant donné son comportement particulier aux allogreffes hépatiques (3, 4).

MATERIEL ET METHODE

Les allogreffes ont été faites entre porcs frères. Dans tous les cas , les parents étaient d'origine distincte, soit tous les deux de race LARGE WHITE, soit l'un étant de race LARGE WHITE et l'autre de race LANDRACE.

Le typage génotypique pour SL- A est assuré par la technique de lymphocytotoxicité (2) et la culture lymphocytaire mixte (5). Les couples sont identiques pour le système érythrocytaire A-O , et sont dans la mesure du possible de sexe opposé, de manière à confirmer par l'analyse du caryotype, la prise effective de la greffe.

Lors de l'irradiation, les animaux étaient âgés de 4, 5 à 5, 5 mois et pesaient entre 41 et 58 kg. Après une quarantaine d'environ 3 semaines, les futurs irradiés reçoivent entre J -8 et J -3, une injection I.M. journalière de 1 Million U.I. de pénicilline et 1 gr de streptomycine. Ce traitement est destiné à améliorer l'état sanitaire des animaux susceptibles de souffrir d'infections inapparentes.

Les conditions d'irradiation ont été décrites (1). Le rayonnement utilisé est celui du ⁶⁰ Cobalt et la dose retenue est 950 rad au plan sagittal, sauf dans un cas où elle a été de 1050 rad. 950 rad correspond à une DL 150% (6). Au cours de l'expérience, le débit de dose a varié entre 52 et 40 rad/minute. Le receveur est irradié à jeun depuis 24 H. et éveillé. La moelle est préparée à partir des zones actives des humérus, fémurs, sternum, hanches, omoplates, prélevées sur le donneur après sacrifice. Les cellules sont mises en suspension dans du milieu synthétique 199 modifié de l' Institut PASTEUR et hépariné à 1 mg/5 ml. Les agrégats cellulaires sont dissociés par aspirations et refoulements à travers une aiguille fine. La numération se fait sur cellule de MALASSEZ

La moelle est injectée sous un volume de 150 - 250 ml par voie veineuse, 5 à 6 heures après la sacrifice du donneur et 20 à 24 H. après l'irradiation de l'hôte maintenu dans une enceinte isolée.

Tout le temps que l'animal ne s'alimente pas, on assure un apport hydrique, calorique et électrolytique équilibré. L'antibiothérapie est instaurée systématiquement pendant au moins 10 à 12 jours. Le traitement comprend : 1 g de Kanamycine, 1 g de Didromycine et 1 Million U.I. de pénicilline G par 24 h. Lorsque cela s'avère nécessaire, les animaux reçoivent des transfusions de plaquettes fraîches.

Les trois premières semaines, les examens hématologiques ont lieu 3 fois par semaine puis une fois tous les 4 à 5 jours. Aucune immunodepression n'a été mise en oeuvre.

RESULTATS

Les résultats présentés ici comprennent 4 groupes d'animaux :

- 1 - Un groupe de 4 porcs témoins irradiés entre 800 et 1000 Rad. non greffés.
- 2 - Un groupe de 3 porcs irradiés à 1000 rad et autogreffés.
- 3 - le 3 ème groupe comprend 8 irradiés à 950 rad qui ont reçu une injection de moelle allogénique d'un frère SL- A identique.

4 - Le 4 ème groupe est constitué de 7 porcs irradiés à 950 rad et 1 irradié à 1050 rad, qui ont reçu une injection de moelle allogénique d'un frère SL-A incompatible pour 1 ou 2 haplotypes.

Le Tableau N° 1 résume les résultats observés dans ces différents groupes.

TABLEAU N° 1

SURVIES COMPAREES DES PORCS IRRADIES A DOSES LETALE
AVEC ou SANS TRAITEMENT PAR GREFFE DE MOELLE OSSEUSE.
LA MOELLE EST SOIT AUTOLOGUE SOIT ALLOGENIQUE SL- A
IDENTIQUE ou SL-A INCOMPATIBLE

NATURE de la GREFFE.	NOMBRE d'ANIMAUX	QUANTITE de CELLULES INJECTEES par Kg de POIDS $\times 10^9$	SURVIES INDIVIDUELLES EN JOURS	MOYENNE EN JOURS
-	4	-	7, 7, 9, 9.	8, 0
Autogreffe	3 ^a	0,123	57, 203, > 360	-
Allogreffes SL-A identique	8	0,990	6, 20, 26, 28, 38, 54, 57, 110.	42,3
Allogreffe SL-A incompatible	8	0,800	5 ^c , 6 ^c , 6, 7, 8, 8 ^c , 9 ^b , 12.	7,6

a : dose d'irradiation : 1000 rad.

b : dose d'irradiation : 1050 rad

c : incompatible pour 1 haplotype.

Les porcs témoins non greffés ont une survie de 8 j. Même à des doses nettement inférieures ^{100, 200} de 400 ou 600 rad, nous n'avons jamais observé de survies spontanées. L'autogreffe de moelle assure la restauration hématologique des 3 porcs irradiés à 1000 rad ; 2 mourront cependant d'infection pulmonaire au 57^{ème} et au 203^{ème} jour. On peut attribuer cette mortalité tardive à une déficience des défenses de l'organisme associée peut-être à des lésions pulmonaires dues à l'irradiation. Il est à noter que chez le porc normal de 7-8 mois, le thymus est parfois très réduit. A l'exception de l'animal mort au 57^{ème} jour, les deux autres présentaient un bon état général avec notamment dans une première étape, la récupération du poids (au 21^{ème} jour pour l'animal ayant survécu plus de 6 mois, et 2 mois pour le troisième), puis un gain régulier.

Tous les allogreffés compatibles, sauf un, ont passé sans difficultés majeures le cap du syndrome hématologique. La moelle de l'animal mort au 6^{ème} jour d'une broncho-pneumonie présentait des signes nets de restauration. La courbe N° 1 montre l'évolution des leucocytes sanguins dans ce groupe, parallèlement à celle des autogreffés. On note une évolution très voisine au moins pendant le 1^{er} mois. Par la suite, il y a une baisse relative dans le groupe des allogreffés, mais le nombre de résultats est trop restreint pour ^{conclure} conclure avec certitude.

A point de vue clinique, après une première phase comparable à celle des autogreffés et qui dure de 15 à 20 jours, l'état général des allogreffés s'altère plus ou moins rapidement. On note surtout un amaigrissement progressif pas nécessairement lié à de l'anorexie ni à des signes digestifs particuliers. Tous sont morts dans un état de cachexie prononcée. Certains d'entre-eux étaient atteints d'infections pulmonaires, ^{alors que} les autres ne présentant aucune lésion apparente. A l'autopsie, les lésions visibles consistent parfois ^{en} à une inflammation oedémateuse de différents segments de l'intestin grêle. Les examens anatomopathologiques qui feront l'objet d'un autre rapport, ont montré dans quelques cas, une inflammation leucocytaire considérable du grêle.

Les lésions dans les territoires lymphoïdes sont plus discrètes. La moelle osseuse présentait dans tous les cas, une cellularité normale au moment de la mort, *ce qui était donc parfaitement factuel.*

A l'opposé du groupe compatible, tous les allogreffés incompatibles sont morts dans les mêmes délais que les témoins, de syndrome hématologique. Un seul a présenté une légère remontée leucocytaire. Dans la plupart

des cas, la moelle était désertique. Il y a ^{eu} toutefois chez plusieurs individus, une réaction histio-réticulaire de la moelle que nous interprétons comme une manifestation de rejet du greffon par l'hôte.

DISCUSSION

Les résultats de la greffe de moelle chez le porc aboutissent à plusieurs constatations intéressantes :

- 1 - L'allogreffe de moelle ne déroge pas à la règle de la compatibilité tissulaire pour le système majeur. Son devenir est comparable à celui des allogreffes de peau, de rein, d'intestin, testées dans cette espèce (7).
- 2 - La prise d'une allogreffe de moelle SL- A incompatible s'est révélée impossible dans nos conditions expérimentales. Malgré la dose d'irradiation très élevée de 950 rad à 1050 rad, l'hôte semble encore capable de rejeter des cellules médullaires SL- A incompatibles. Les conditions de la prise de la greffe de moelle incompatible chez le porc semblent donc plus délicates que chez le chien (8, 9) ou le singe (10). Il est difficile toutefois d'envisager des doses d'irradiation plus élevées car nous sommes à la limite du syndrome gastro-intestinal (11).
- 3 - La compatibilité SL- A assure au contraire un succès initial dans 100% des cas. Mais il se développe régulièrement une maladie cachectisante fat dans un délai assez court. On ne peut pas l'attribuer aux séquelles de l'irradiation car les autogreffes à des doses comparables ne présentent pas cette symptomatologie. Nous pensons qu'il ^{doit} s'agir d'une maladie de greffe contre hôte (G V H), mais seuls les résultats anatomo-pathologiques pourront le confirmer.

Les animaux n'ont souvent présenté que de petits épisodes de diarrhée. Nous n'avons d'autre part, pas constaté d'ictères ni de lésions de la peau ou des muqueuses qui sont caractéristiques de la G V H classique (12, 13).

En conclusion, on peut dire que le complexe d'histocompatibilité SL- A du porc joue un rôle majeur dans la prise de l'allogreffe de moelle osseuse. La dose d'irradiation utilisée, bien que très supérieure à la dose létale, ne déprime pas suffisamment les défenses de l'hôte pour permettre de surmonter la barrière SL- A. En outre, la compatibilité génotypique SL- A évite pas le développement d'une maladie secondaire régulièrement mortelle. Le porc, de ce fait, peut être considéré, ainsi qu'il l'est déjà dans le domaine de la radiobiologie, comme un bon modèle pour l'étude de l'allogreffe médullaire.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - VAIMAN, M. ; DUBIEZ, R. ; COLSON, X. ; NIZZA, P. : Int. J. Radiat. Biol. 14 : 207, 1968.
- 2 - VAIMAN, M. ; RENARD, Ch. ; LAFAGE, P. ; AMETEAU, J. ; NIZZA, P. : Transplantation . 10 : 155, 1970.
- 3 - CALNE, R.Y. ; SELIS, R.A. ; PENA, J.R. ; DAVIS, D.R. ; MILLARD, P.R. ; HERBERTSON, B.M. , BINNS, R.M. ; DAVIES, D. A Nature . 223 : 472, 1969.
- 4 - CHOMETTE, G. ; GARNIER, H. ; CLOT, J.P. ; PINAUDEAU, Y. ; AURIOL, M. ; BROCHERIOU, C. : Ann. Anat. Pathol. 14 : 151, 1969
- 5 - VAIMAN, M. ; ARNOUX, A. ; FILLEUL, X. ; NIZZA, P. : C.R. Acad. Sc. Paris , 271 : 1724, 1970.
- 6 - CHAMBERS, F.W. ; BILES, C.R. ; BODENLOS, L.J. ; DOWLING, J.F. Radiation Res. 22 : 316, 1964.
- 7 - VAIMAN, M. : Thèse Doctorat es-Sciences. Faculté des Sciences Paris , 1973
- 8 - , DALE, D.C. ; GRAW, R.G. : Science 183 : 83, 1974.
- 9 - STORB, R. ; RUDOLPH, R.H. ; THOMAS, E.D. : J. of Clinical Investigation 50 : 1272, 1971.
- 10- CROUCH, B.G. ; Van PUTTEN, L.M. ; Van BEKKUM, D.W. ; de VRIES, M.J. : J. Nat. Cancer Invest. 27 : 53, 1961.
- 11 - JONES, S.R. ; GEORGE, R.E. ; WEST, J.E. ; VERRELLI, D.M. : Rad. Res. 50 : 504, 1972.

Bibliographie ... suite.....

- 12 - Van BEKKUM, D.W. ; de VRIES , M.J. : Logos Press Ld London :
p. 127 , 1967.

- 13 - STORB, R. ; RUDOLPH, R.H. ; KOLB, H.J. ; GRAHAM, T.C. ;
MICKELSON, E. ; ERICKSON, V. ; LERNER, K.G. ; KOLB, H. ;
THOMAS, E.D. : Transplantation 15 : 92 , 1973.