

Etude microscopique de transplantations hépatiques allogéniques chez le porc

G. CHOMETTE, H. GARNIER, J. P. CLOT, Y. PINAudeau, M. AURIOL
et C. BROCHERIOU

Services d'Anatomie pathologique (Pr. Ag. G. CHOMETTE) et de Chirurgie (Pr. MERCADIER)
Centre Hospitalo-Universitaire Pitié-Salpêtrière Paris

Reçu Decembre 18, 1968

Microscopic Study of Liver Orthotopic Transplantation in the Pig

Summary. Ten orthotopic allogenic transplantations of porcine liver survived from 24 hours to several months permitting the study of histomorphological variations of the graft. Beside the initial risk of massive liver necrosis (three animals died within 24—40 hours), the acute rejection that began early (third day) reached maximum intensity at the end of the first week. As in other kinds of transplantation (kidney, heart) the rejection was characterized by the presence of mononuclear cells (lymphocytes, blastoid cells) in the small vessels and adjacent mesenchyma. This reaction was generally moderate; we observed just once a really massive "inflammatory hepatitis".

In the animals which survived from one five and a half months, it was surprising to note that the initial rejection-reaction tended to disappear: the portal granuloma was replaced by sclerosis about biliary vessels; this sclerosis might be a possible cause of hepatobiliary infection frequently observed during this period.

In one animal only very thin strips of inflammatory sclerosis persisted delimiting large hepatic lobules.

In conclusion, we believe that in the particular case of porcine liver the initial reaction of rejection is followed by a real tolerance and from time to time by a compensatory hypertrophy of the graft.

Résumé. Dix transplantations hépatiques allogéniques effectuées chez le porc et suivies de survies oscillant entre 24 heures et plusieurs mois, ont permis l'étude des variations histomorphologiques du greffon dans le temps. Hormis le risque initial de nécrose massive du transplant (3 animaux décédés en 24 à 48 heures), la réaction de rejet aigu, ébauchée dès le 3ème jour, atteint toute son ampleur au 7ème jour. Comme dans d'autres viscères (rein et coeur notamment) elle se traduit par une prolifération de cellules mononucléées (lymphocytes, cellules blastoïdes) dans les vaisseaux puis dans le mésenchyme adjacent. Mais elle est habituellement très modérée, n'ayant déterminé qu'une seule fois une véritable "hépatite inflammatoire" massive et nécrosante. De surcroît, chez les animaux ayant survécu plus longtemps (1 mois à 5 mois et demi), il est frappant de constater que cette réaction de rejet initiale tend à se stabiliser, voire même à disparaître: au granulome actif portal succède une sclérose cicatricielle favorisant sans doute par son retentissement sur les canaux biliaires la survenue d'infections hépato-biliaires très fréquentes durant cette période. Dans un cas même, il ne persistait que de minces bandes de sclérose inflammatoire délimitant des lobules hépatiques très volumineux.

En somme, aux réactions immunologiques antagonistes provoquées initialement par la transplantation, semble succéder, chez le porc, un véritable état de tolérance s'accompagnant même parfois d'une hypertrophie compensatrice du greffon.

Nos connaissances au sujet du syndrome immunologique de rejet lors de greffes allogéniques sont bien codifiées à l'heure actuelle pour diverses transplantations viscérales, notamment rénales et même cardiaques. Par contre, en

matière de transplantation hépatique, elles demeurent encore assez succinctes depuis les premières expérimentations de WELCH (1955) et malgré les travaux plus récents de quelques écoles (STARZL, MOORE, CALNE, MIKAELOFF, 1965). Cette discordance tient en grande partie à la lourde léthalité qui grève encore aujourd'hui un tel type d'intervention chirurgicale.

Notre étude a pour but de préciser, sur un plan purement histomorphologique, le comportement dans le temps de transplants hépatiques effectués chez le porc. Elle est le fruit, rappelons-le, de multiples séries expérimentales effectuées depuis 4 ans par GARNIER et CLOT (1965), la dernière ayant permis récemment d'importantes survies.

Materiel et methodes

La série expérimentale rapportée ici concerne dix porcs. Bien que nous ne possédions encore que peu de connaissances théoriques sur l'immunogénétique de cette espèce et les divers groupes d'histo-compatibilité, nous avons pratiqué ces greffes dans des conditions allogéniques certaines grâce à des animaux provenant de deux élevages différents. Aucun d'entr'eux, précisons-le, n'a reçu de thérapeutique immunodépressive.

La technique opératoire a consisté en transplantations orthotopiques pratiquées de la façon suivante:

L'intervention est conduite de façon synchrone sur le donneur et le receveur de façon à diminuer le temps d'ischémie hépatique. L'anesthésie est effectuée par inhalation préalable de Fluothane puis par injection intraveineuse de Pentotal + Curare. Les animaux sont alors intubés sous respiration assistée.

L'intervention, effectuée par voie abdominale, comporte la dissection des différents pédicules vasculaires: veine cave sus-hépatique, veine cave sous-hépatique, veine-porte, artère hépatique et voies biliaires. Ce temps une fois terminé, le cathéter est placé dans la veine porte du donneur et par ce cathéter est perfusé pendant 10 à 15 minutes du sérum physiologique à 4°. Le receveur subit habituellement une splénectomie dans le but de créer un shunt temporaire entre veine splénique et veine jugulaire, shunt permettant la décompression du système porte durant le clampage vasculaire. On procède alors à l'hépatectomie du receveur et à la transplantation avec anastomoses des différents pédicules vasculaires (cave sus-hépatique, cave sous-hépatique, veine porte, artère hépatique). Enfin est réalisée une anastomose bilio-digestive à type de cholecysto-duodénostomie. Notons que le temps d'ischémie du greffon oscillait entre 30 et 40 minutes.

La *surveillance clinique et biologique* post-opératoire fut effectuée grâce à divers tests (le bilan des fonctions hépatiques étant apprécié par l'étude des transaminases, de l'Ornithine carbamyl transférase et de la bilirubine). Celle-ci fut poursuivie jusqu'au maximum de survie des animaux, aucun d'eux n'ayant été sacrifié.

L'*étude anatomopathologique* a comporté une *nécropsie complète* à la recherche, notamment, des circonstances de mortalité précoce (hémorragie digestive, thrombose sur les sutures, ulcère dont la fréquence a fait préconiser par certains une gastrectomie systématique préventive, enfin infection tant biliaire que viscérale). Nous nous sommes efforcés d'autre part, par un *examen attentif du foie* de détecter d'éventuelles thromboses vasculaires intra-hépatiques, des foyers d'infection et de suppuration. L'étude histologique a porté sur de nombreux prélèvements, les modifications s'avérant très variables, en effet, d'un point à l'autre du transplant. Les colorations utilisées ont été les suivantes: hématoéine-éosine, orcéine, réticuline, P.A.S.

Résultats

Chez les 10 porcs ainsi étudiés, la survie peut être définie comme suit:

3 morts précoces par nécrose hépatique immédiate et par infection (24—48 heures),

3 morts au 7ème jour de rejet aigu,

4 décès plus tardifs respectivement aux 30ème, 55ème, 66ème et 171ème jours.

Les constatations que nous pouvions faire sur les transplants peuvent être schématisées selon la période précoce ou tardive du décès de ces animaux.

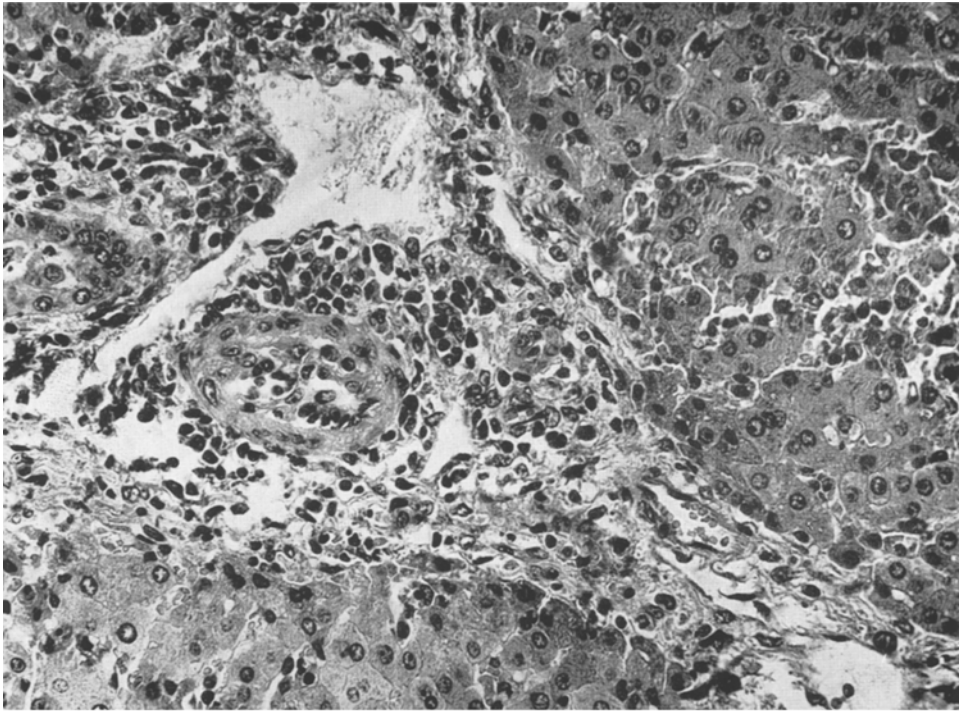
1. Décès précoce après la transplantation. Chez les animaux décédés le premier jour, le fait dominant réside dans la *nécrose intense*, plus ou moins totale du *transplant*: macroscopiquement, le foie est jaune, nécrotique, avec alternance de zones congestives. Du point de vue histologique, les hépatocytes sont détruits par une nécrose acidophile de coagulation et les capillaires sont légèrement congestionnés. Après une *survie de 24 à 48 heures*, apparaissent des polynucléaires et s'ébauchent de véritables foyers de suppuration. Enfin, chez d'autres animaux morts un peu plus tardivement (*48 heures — 3 jours*), les *premiers éléments mononucléés apparaissent dans les vaisseaux*. La réaction de rejet qui s'amorce à cette phase initiale est constituée de cellules hyperbasophiles et surtout blastoïdes (cellules de type lymphocytoïde, à noyau souvent vésiculeux et nucléolé). Celles-ci tendent à obstruer les lumières artériolaires et à gagner les capillaires. Notons que leur individualisation est souvent difficile parmi les nombreux polynucléaires qui prédominent à cette phase précoce.

Au 7^{ème} jour, la réaction de rejet domine les aspects morphologiques. Elle est à vrai dire assez semblable à celle vue dans d'autres organes (cœur, rein).

D'intensité moyenne le plus souvent, elle se manifeste par l'apparition de cellules mononucléées (lymphocytes, cellules blastoïdes et parfois déjà quelques plasmocytes) qui colonisent au premier chef les vaisseaux et le mésenchyme portal (Fig. 1 a). Ces cellules occupent d'abord les lumières vasculaires, notamment les artérioles, adhérant à leur endothélium dont les éléments turgescents, presque pédiculés, s'intriquent avec elles (Fig. 1 b). Souvent cloisonnées par une trame fibrineuse lâche, elles tendent à former de véritables bouchons obstruant le lit artériolaire. Outre les artérioles, elles comblent les capillaires de l'espace-porte, avant de diapédésier à travers leur paroi dans le conjonctif voisin. Dans le mésenchyme portal, elles pullulent, s'isolent des vaisseaux et s'ordonnent très souvent autour de canaux biliaires, (Fig. 2 a) dont la vitrée demeure intacte et l'épithélium peu altéré. Enfin, certaines tendent à gagner la périphérie des lobules hépatiques. Ceux-ci sont souvent nécrosés en leur centre, (Fig. 2 b) sans que la genèse de cette nécrose puisse apparaître avec évidence: conséquence de l'ischémie initiale [comme le pense LINDQUIST (1968) pour le rein] ?, symptôme «satellite» de la réaction de rejet? Notons pourtant, en faveur de la première hypothèse, que généralement les cellules mononucléées restent à distance des plages nécrotiques, ne pénétrant qu'en périphérie des lobules en s'accolant, çà et là, à quelques cellules de Küpfer (Fig. 3). Chez un seul animal, le tableau était celui d'un *rejet absolument massif*. Les vaisseaux artériolaires avaient une paroi imbibée d'une substance oedémateuse et le mésenchyme était infiltré d'éléments mononucléés. Mais, surtout, les lobules parenchymateux apparaissaient à la fois nécrosés et inondés par les cellules mononucléées. Seuls alors les vestiges réticuliniques individualisés par les colorations électives permettaient d'identifier la trame lobulaire pré-existante.

Au total, la réaction de rejet aigu s'individualise par les caractères suivants: à un stade précoce, elle s'exprime par la pullulation de cellules mononucléées dans les vaisseaux; plus tard, elle exerce son action de façon plus massive sur le

a



b

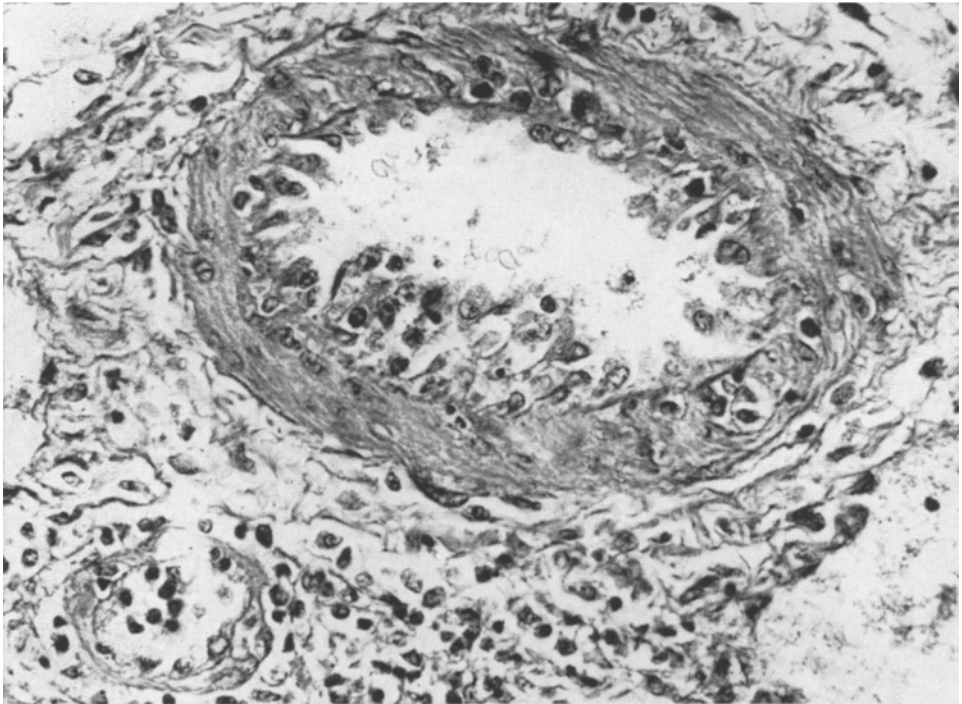
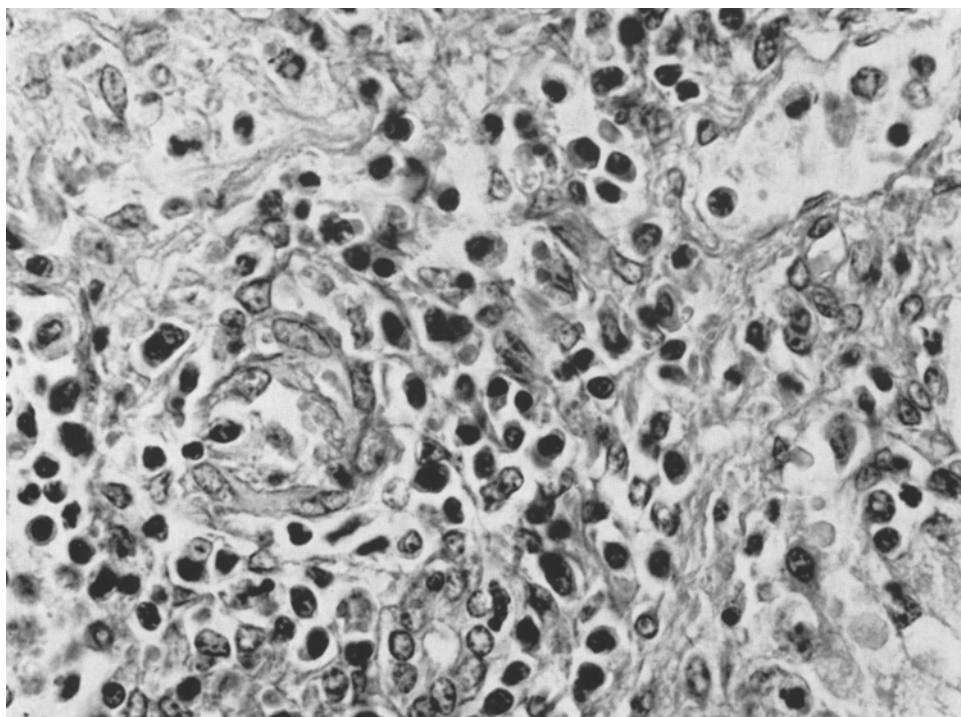
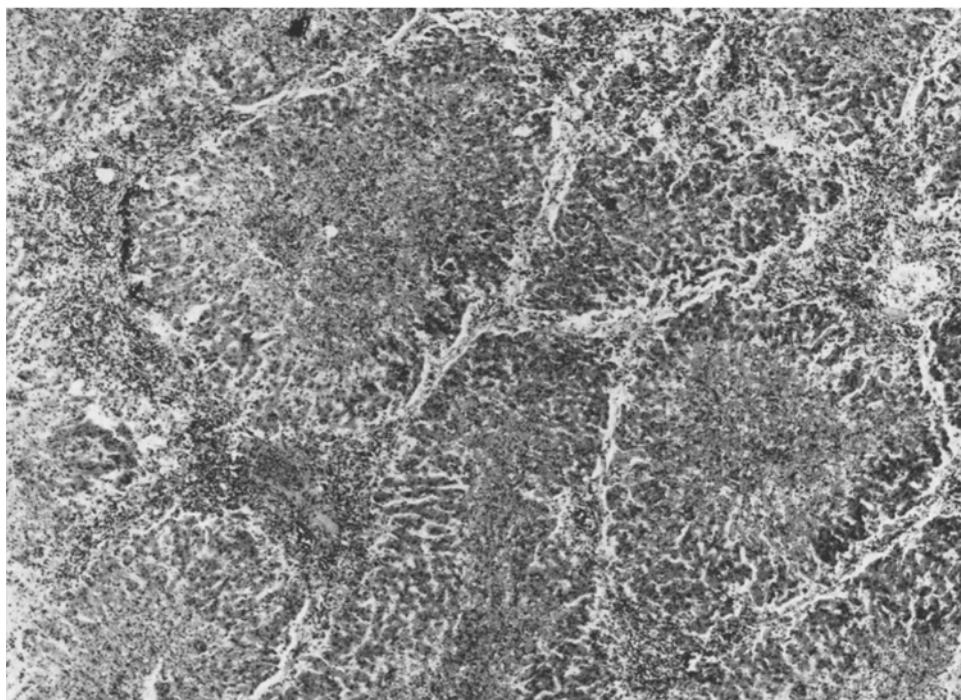


Fig. 1. a Rejet au 7ème jour. Colonisation de cellules mononucléées dans une artériole hépatique et le mésenchyme voisin. H.E. G. $\times 400$. b Rejet au 7ème jour. Artériole hépatique: accollement pariétal de cellules mononucléées et intrication de celles-ci avec des éléments endothéliaux pédiculés; début de franchissement mural par les éléments mononucléés. H.E. G. $\times 560$



a



b

Fig. 2. a Rejet au 7ème jour. Espace porte: pullulation d'éléments mononucléés (lymphocytes, cellules hyperbasophiles et plasmocytes); concentration autour d'une artériole et d'un canalicule biliaire. H.E. G. $\times 900$. b Rejet au 7ème jour. Nécrose centrolobulaire massive et réaction "inflammatoire" portale. H.E. G. $\times 63$

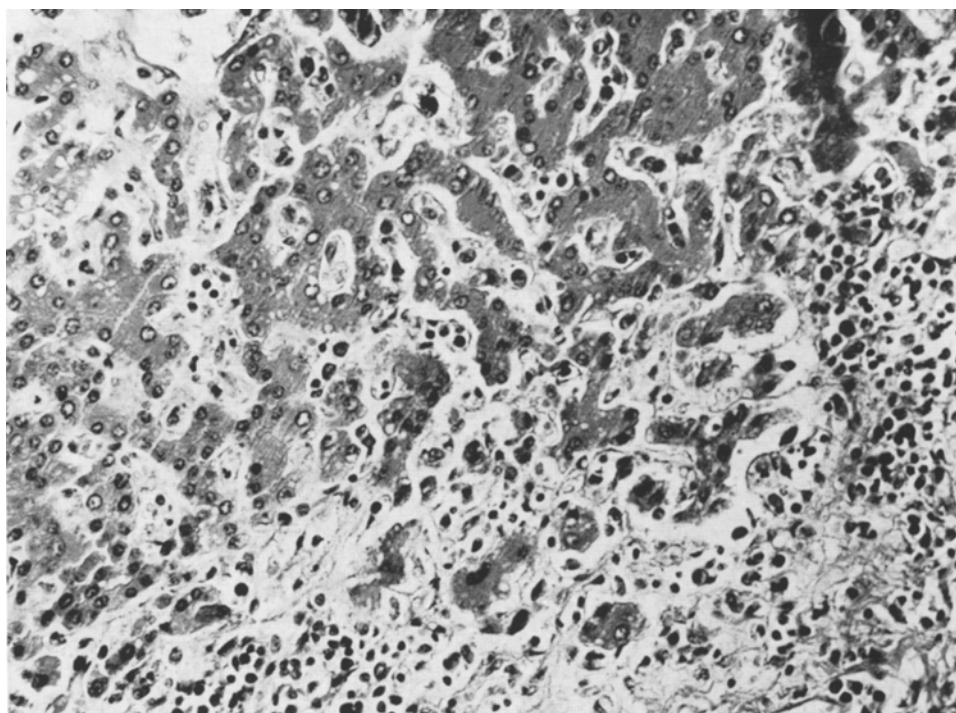


Fig. 3. Rejet au 7ème jour. Infiltration de cellules mononucléées ainsi que de leucocytes polynucléaires à la périphérie d'un espace porte. Pénétration entre les travées et images d'accolement aux cellules de Kupfer. H.E. G. $\times 300$

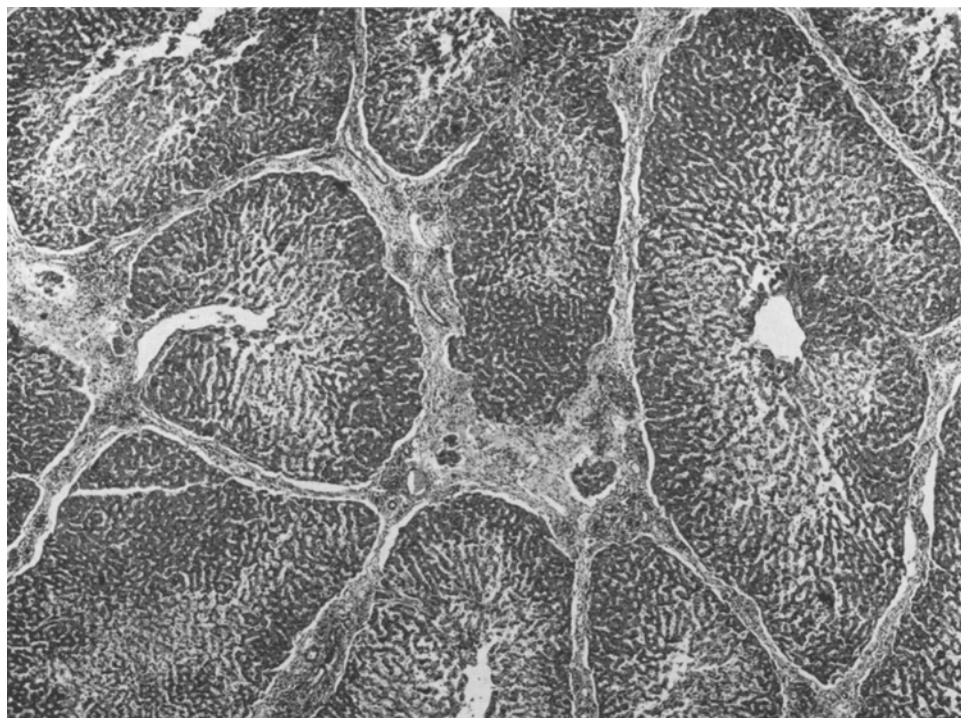
mésenchyme hépatique. Mais il est rare qu'elle soit suffisamment intense pour aboutir à une véritable «hépatite inflammatoire» massive et destructive.

2. *Dans les mois qui suivent la greffe*, c'est-à-dire pour les quatre derniers animaux de notre série expérimentale, les modifications observées étaient les suivantes.

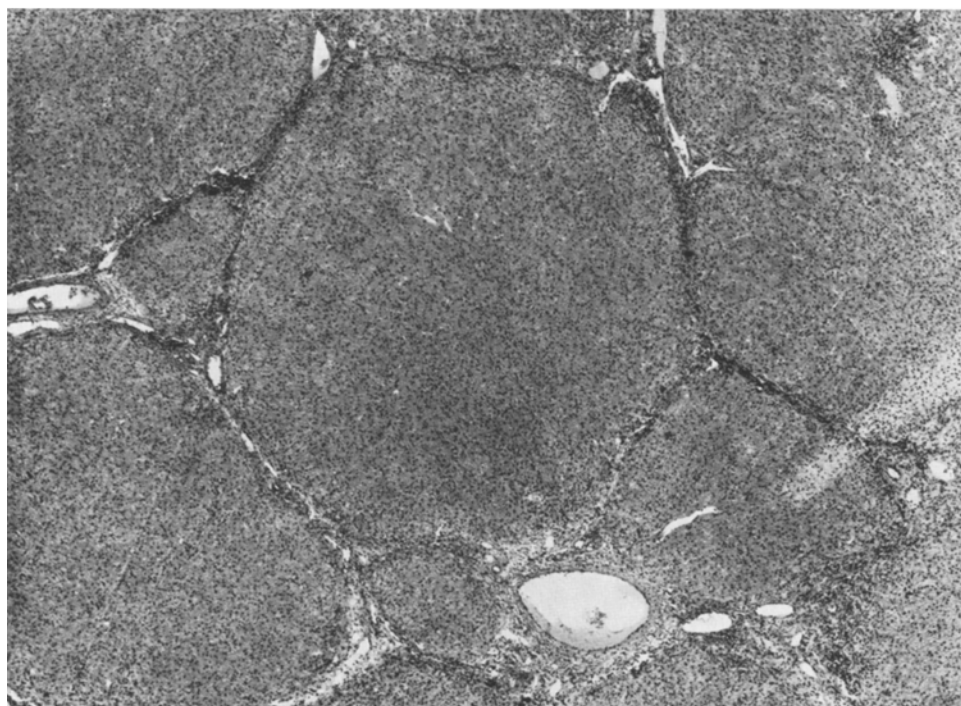
La réaction de rejet tend à disparaître ou du moins à se stabiliser. Il ne s'agit plus d'un rejet aigu mais d'une réaction beaucoup plus discrète dont les conséquences n'étaient qu'une seule fois léthales. Parfois elle se limite à la présence de quelques cellules mononucléées dans les vaisseaux artériolaires, cellules dont l'activité vis-à-vis de l'endothélium semble se pérenniser pendant plusieurs mois. A un degré de plus, elle se traduit par un granulome actif, bouleversant la structure de l'espace-porte et poussant quelques pointes d'expansion dans les lobules hépatiques voisins (Fig. 4a). Plus tard, le granulome semble s'assoupir, laissant place à un tissu fibreux et cicatriciel dans lequel sont enchassés de nombreux micro-tubules, vestiges de travées hépatiques différenciées.

D'autre part, il semble possible que toute réaction évolutive et tout témoin cicatriciel puissent s'estomper sous l'effet d'une hypertrophie hépatique. Chez un animal en effet, nous constatons de volumineux lobules parenchymateux qui n'étaient délimités que par de minces bandes de sclérose inflammatoire (Fig. 4b).

Contrastant avec la discrétion du rejet, à cette phase tardive, les infections hépatobiliaires semblent de plus en plus fréquentes sans qu'il soit possible d'en



a



b

Fig. 4. a Rejet au 55ème jour. Granulome actif interessant les sepaces portes et érodant la périphérie des lobules. H.E. G. $\times 46$. b Hypertrophie hépatique chez un animal ayant survécu 171 jours: grosse hypertrophie lobulaire (comparer à la figure précédente); très discrète inflammation portale. H.E. G. $\times 46$

préciser le déterminisme exact. Beaucoup sont segmentaires et semblent conditionnées sans doute par les anastomoses hépato-biliaires chirurgicales mais aussi par les importantes séquelles provoquées au niveau des canaux biliaires par la réaction de rejet initiale.

En somme, à l'inverse de ce qui est obtenu si souvent dans les greffes allogéniques viscérales, les transplantations hépatiques à un stade tardif ne présentent chez le porc que peu d'altérations. La réaction de rejet initiale fait place, semble-t-il, à un véritable état de tolérance permettant même d'importantes compensations hypertrophiques. Bien plus, les stigmates des phénomènes initiaux ne laissent que peu de traces: rares plages de sclérose mutilante çà et là dans quelques lobules. Fait très curieux, la plupart des artérioles oblitérées initialement par les bouchons fibrino-cellulaires sont alors redevenues perméables sans thrombose organisée séquelleaire.

Telles se présentent les caractéristiques principales de nos transplantations. L'examen viscéral complet des animaux permet d'y ajouter deux notions importantes.

Tout d'abord nous n'avons jamais observé de déplétion cellulaire importante dans les organes lymphoïdes du receveur et ceci malgré même l'amplitude, extrême dans certains cas, de la réaction de rejet et les colonisations cellulaires mononucléées dans le transplant.

D'autre part, il n'existait, chez l'hôte aucune réaction morphologique susceptible d'évoquer, étant donné les qualités particulières du transplant et sa richesse en éléments du système réticulo-endothélial (ainsi que le souligne MACBRIDE, 1962), la possibilité d'une réaction greffe contre hôte ou celle d'une réaction auto-immune (telles par exemple les modifications observées à une phase tardive dans les transplantations rénales — HAMBURGER, 1967).

Conclusions

En somme, les transplantations hépatiques effectuées chez le porc nous permettent quelques réflexions:

Tout d'abord elles confirment l'uniformité du syndrome de rejet quels que soient l'espèce animale en cause et le viscère considéré. Celui-ci revêt d'abord exclusivement le type des réactions d'hypersensibilité retardée avec afflux dans les vaisseaux du greffon de cellules blastoïdes et lymphocytiques, informées de l'existence du transplant (KINSARD-SMITH, KOSECK, PORTER, 1967). Plus tard, la réaction d'incompatibilité devient plus complexe et plus diffuse. Elle s'exprime par des altérations vasculaires plus considérables (oedème, colonisation vasculaire pariétale). Et les études en immunofluorescence ont déjà montré d'ailleurs, dans d'autres viscères (PARONETTO, 1965), l'importance des anticorps sériques (I.G.G.) liés au complément dans le déclenchement d'une telle réaction. Ainsi, un véritable mécanisme d'immunité humorale serait-il mis en jeu (PORTER, 1965).

En deuxième lieu, il apparaît curieux, comme l'avait déjà souligné CALNE (1968), que les phénomènes initiaux d'antagonisme immunologique puissent, en l'absence de toute thérapeutique immuno-dépressive s'assoupir en quelques semaines, se réduire à un granulome simple et peu actif, voire laisser place à un véritable état de tolérance du receveur vis-à-vis du transplant. Notons que cet état de tolérance, loin de réaliser un équilibre précaire, peut aboutir dans

cette espèce animale à une compensation hypertrophique considérable. Ceci n'est pas sans poser des problèmes biologiques plus généraux concernant tant la compatibilité ou l'incompatibilité allogéniques que la régulation de la régénération hépatique.

Bibliographie

- CALNE, R. Y., J. O. WHITE, B. M. HERBERTSON, P. R. MILLARD, D. R. DAVIS, J. R. SALAMAN, and J. R. SAMUEL: Pig to baboon liver xenografts. *Lancet* **1968I**, 1176—1178.
- — O. E. YOFFA, R. M. BINNS, R. R. MAGINN, R. M. HERBERTSON, P. R. MILLARD, V. P. MOLINA, and D. R. DAVIS: Prolonged survival of liver transplants in the pig. *Brit. med. J.* **1967**, 645—648.
- GARNIER, H., J. P. CLOT, M. BERTRAND, PH. CAMPLEZ, A. KUNLIN, J. P. GORIN, LECOAZIOU, R. LEVY et G. CORDIER: Biologie expérimentale: greffe de foie chez le porc: approche chirurgicale. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 24 Mai 1965.
- HAMBURGER, J., et J. CROSNIER: Le concept de rejet d'allogreffe et ses avatars. *Rev. franç. Étud. clin. biol.* **12**, 217—222 (1967).
- KINSARD-SMITH, P.: Histological diagnosis of rejection of renal homograft in man. *Lancet* **1967II**, 849.
- KOSEK, J. C., E. J. HURLEY, and R. R. LOWER: Histopathology of orthotopic canine cardiac homografts. *Lab. Invest.* **19**, No 1, 97—112 (1968).
- LINDQUIST, R. R., R. D. GUTTMAN, and J. P. MERRIL: Renal transplantation in the inbred rat-V-Histochemical studies of acute renal allograft rejection. *Amer. J. Path.* **52**, 1145—1168 (1968).
- MALLURET, J., P. COEUR, P. MIKAELOFF et L. DUMONT: Etude histologique et histochimique du foie de chien après transplantation orthotopique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **72**, 1430—1434 (1966).
- MCBRIDE, R. A., H. BROWNELL WHEELER, L. L. SMITH, F. D. MOORE, and J. DAMMING: Homotransplantation of the canine liver as an orthotopic vascularised graft. Histologic and functional correlations during residence in the new host. *Amer. J. Path.* **41**, 501 (1962).
- PARONETTO, F., R. E. HOROWITZ, A. SICULAR, C. BURROWS, A. E. KARK, and H. POPPER: Immunologic observations in homografts. 1. The canine liver. *Transplantation* **3**, 303—317 (1965).
- PORTER, K. A.: Morphological aspects of renal homograft rejection. *Brit. med. Bull.* **21**, 171—175 (1965).
- STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, K. A. PORTER, P. O. TAYLOR, T. D. FARIS, T. J. HERRMANN, C. J. HLAD, and W. R. WADDELL: Factors determining short and long term survival after orthotopic liver Homotransplantation in the dog. *Surgery* **58**, 131—141 (1965).
- STUART, F. P., C. TORRES, W. J. HESTER, G. J. DAMMIN, and F. D. MOORE: Orthotopic autotransplantation and allotransplantation of the liver. Functional and structural patterns in the dog. *Ann. Surg.* **165**, 325—340 (1967).
- WELCH, C. S.: A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplantation Bull.* **2**, 54—55 (1955).

Pr. Agrégés G. CHOMETTE et H. GARNIER
Hôpital La Pitié
83, boulevard de l'Hôpital
Paris XIIIème 75