

EUR 3261.i

COMUNITA' EUROPEA DELL'ENERGIA ATOMICA - EURATOM

LIBRARY COPY

**RICERCA SULLA DIFFERENZIAZIONE DI
CELLULE IMMUNOLOGICAMENTE COMPETENTI
IN ANIMALI IRRADIATI**

Relazione finale 1963-1965

di

G. DORIA
(EURATOM)

1967



Relazione elaborata dal
Comitato Nazionale dell'Energia Nucleare - C.N.E.N.
Centro Studi Nucleari - Gruppo di Immunogenetica, Casaccia (Roma) - Italia

Contratto Euratom N. 021-63-3 BIOI

AVVERTENZA

Il presente documento è stato elaborato sotto gli auspici della Commissione della Comunità Europea dell'Energia Atomica (EURATOM).

Si precisa che la Commissione dell'Euratom, i suoi contraenti, o qualsiasi altra persona che agisca in loro nome :

non garantiscono l'esattezza o la completezza delle informazioni contenute nel presente documento, nè che l'uso di qualsiasi informazione, dispositivo, metodo o processo, descritti nel presente documento, non arrechino pregiudizio ai diritti sulle opere dell'ingegno e sulle invenzioni industriali;

non assumono alcuna responsabilità per i danni che dovessero risultare dall'uso di informazioni, dispositivi, metodi o processi descritti con il presente documento.

La presente relazione può essere acquistata presso gli uffici vendita indicati nella quarta pagina della copertina

al prezzo di Lit. 620

FF 5,—

FB 50,—

DM 4,—

Fl. 3,60

All'atto dell'ordinazione, si prega di menzionare il riferimento EUR e il titolo, che figurano sulla copertina di ciascuna relazione.

Stampato da Guyot, s.a.

Bruxelles, marzo 1967

Per la riproduzione di questo documento ci si è serviti della miglior copia disponibile.

EUR 3261.i

COMUNITA' EUROPEA DELL'ENERGIA ATOMICA - EURATOM

RICERCA SULLA DIFFERENZIAZIONE DI CELLULE IMMUNOLOGICAMENTE COMPETENTI IN ANIMALI IRRADIATI

Relazione finale 1963-1965

di

G. DORIA
(EURATOM)

1967

EUR 3261.i

STUDY ON THE DIFFERENTIATION OF IMMUNOLOGICALLY-
COMPETENT CELLS IN IRRADIATED ANIMALS
Final Report 1963-1965 by G. DORIA (Euratom)

European Atomic Energy Community - EURATOM
Report prepared by the Comitato Nazionale per l'Energia Nucleare - CNEN
Centro Studi Nucleari - Gruppo di Immunogenetica, Casaccia (Rome) - Italy
Euratom Contract No. 021-63-3 BIOI
Brussels, March 1967 - 26 Pages - FB 50

Researches have been carried out on the differentiation of immunologically-
competent cells in rats irradiated and transplanted with hemopoietic tissue.
In particular, a study has been made of the role of the irradiated thymus in
adoptive immunity.

Centro S

RIASSUNTO

Sono state condotte ricerche sulla differenziazione di cellule immunologicamente competenti in topi irradiati e trapiantati con tessuti emopoietici. In particolare, si è studiato il ruolo del timo irradiato nell'immunità adottiva.

RICERCA SULLA DIFFERENZIAZIONE DI CELLULE IMMUNOLOGICAMENTE
COMPETENTI IN ANIMALI IRRADIATI (*)

L'esecuzione dei lavori ha avuto inizio nel 1964 con l'assunzione del personale del Gruppo, l'allestimento delle attrezzature del laboratorio, e l'allevamento degli animali.

Sono state condotte ricerche sulla differenziazione di cellule immunologicamente competenti in topi irradiati e trapiantati con tessuti emopoietici. In particolare, si è studiato il ruolo del timo irradiato nell'immunità adottiva.

Esperimenti e risultati sono qui descritti.

L'importanza del timo nello sviluppo del sistema immunitario è ben dimostrata dalle seguenti osservazioni:

- 1) animali adulti, timectomizzati alla nascita, hanno tessuti linfatici scarsamente sviluppati e sono incapaci di produrre anticorpi con vigore normale ;
- 2) la riparazione spontanea del sistema immunitario di animali adulti esposti ad una dose subletale di raggi X dipende dalla presenza del timo.

In queste ricerche si è voluto analizzare quantitativamente la timo-dipendenza della risposta immunitaria di cellule emopoietiche di diversa origine trapiantate in topi letalmente irradiati. Topi timectomizzati e normali sono stati totalmente esposti a 800 R di raggi X e trapiantati con cellule midollari o spleniche. A vari tempi dal trapianto, i riceventi sono stati iniettati con globuli rossi di montone (G.R.M.) due volte a 6 giorni di intervallo e salassati 6 giorni dopo ciascuna iniezione di antigene per la titolazione di agglutinine seriche anti G.R.M. I risultati di questi esperimenti sono riportati nelle tabelle I, II e III.

(*) Manoscritto ricevuto il 23 novembre 1966.

TABELLA I - Risposta primaria (I) e secondaria (II) di 2×10^7 cellule midollari normali stimulate con antigene a vari tempi dal trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi	Giorni fra trapianto e prima iniezione di antigene							
	15		30		45		60	
irradiati	I	II	I	II	I	II	I	II
Normali	0.2	3.2	4.9	8.3	5.0	7.5	5.8	9.4
	0.1	0.4	0.5	0.2	0.4	0.4	0.2	0.2
	17	16	11	9	19	17	18	17
Timectomizzati	0.0	0.4	0.8	0.9	1.3	2.0	1.0	1.8
	0.0	0.2	0.2	0.2	0.4	0.6	0.2	0.5
	16	14	12	13	12	12	16	16

In ogni casella sono incolonnati la media del \log_2 del titolo di agglutinine, l'errore standard, e il numero di osservazioni.

TABELLA II - Risposta primaria (I) e secondaria (II) di 2.4×10^7 cellule spleniche normali stimulate con antigene a vari tempi dal trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi irradiati	Giorni fra trapianto e prima iniezione di antigene									
	15		30		45		60		60	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Normali	2.1	5.8	3.8	5.9	5.9	7.5	6.3	8.4		
	0.4	0.7	0.5	0.3	0.3	0.6	0.7	0.02		
	12	13	18	16	17	17	15	14		
Timectomizzati	2.3	7.4	3.1	6.8	5.2	7.6	5.4	7.7		
	0.2	0.6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3		
	18	15	15	14	17	16	15	12		

Vedi tabella I

TABELLA III - Risposta primaria (I) e secondaria (II) di varie dosi di cellule midollari e spleniche normali stimolate con antigene 60 e 66 giorni dopo il trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi	M i d o l l o				M i l z a			
	2 x 10 ⁶		20 x 10 ⁶		5 x 10 ⁶		24 x 10 ⁶	
Irradiati	I	II	I	II	I	II	I	II
Normali	5.5	9.3	5.8	9.4	7.1	8.0	6.3	8.4
	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.7	0.02
	19	14	18	17	37	36	15	14
Timectomizzati	0.9	2.2	1.0	1.8	3.7	7.1	5.4	7.7
	0.2	0.6	0.2	0.5	0.2	0.2	0.2	0.3
	18	18	16	16	36	36	15	12

Vedi tabella I.

La risposta primaria e secondaria delle cellule midollari è notevolmente ridotta nei timestomizzati rispetto ai normali, indipendentemente dal tempo di stimolazione antigenica e dalla dose di cellule trapiantate. L'effetto della timestomia dei riceventi sulla risposta primaria e secondaria delle cellule spleniche è molto meno marcato e risulta evidente solo se si trapianta una piccola dose di cellule.

La differenza in timo-dipendenza tra cellule midollari e spleniche suggerisce l'esistenza di due tipi di cellule potenzialmente competenti : PC_0 (timo dipendente) e PC_1 (timo indipendente). Le cellule PC_0 sarebbero prevalenti nel midollo osseo, le PC_1 nella milza. L'antigene stimolerebbe le cellule PC_1 trasformandole in cellule immunologicamente competenti. Secondo questo modello, il timo potrebbe agire sulle cellule potenzialmente competenti promuovendo la differenziazione delle cellule PC_0 a PC_1 . Il diverso grado di timo-indipendenza della risposta di 5×10^6 e 24×10^6 cellule spleniche (tab.III) potrebbe essere attribuito al grado di riempimento del compartimento PC_1 . L'eventuale saturazione di questo compartimento dovuta all'iniezione di 24×10^6 cellule potrebbe rendere inefficiente la differenziazione delle cellule PC_0 nei riceventi normali.

La specificità dell'azione del timo sulle cellule PC_0 è suggerita dai risultati di esperimenti in cui cellule di milza sono state stimulate dall'antigene al tempo di trapianto oppure 10 giorni prima di essere trapiantate e ristimate.

I risultati del primo esperimento sono riportati nella tabella IV che mostra la risposta primaria di cellule di milza trapiante in varie dosi in topi normali e timectomizzati.

TABELLA IV - Risposta primaria di varie dosi di cellule spleniche normali stimulate con antigene al tempo del trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi	cellule spleniche ($\times 10^6$)			
	24	48	96	192
Normali	3.1	5.7	6.6	7.4
	0.4	0.4	0.3	0.4
	20	31	30	17
Timectomizzati	2.2	4.2	5.0	6.6
	0.3	0.2	0.3	0.2
	13	22	21	14

Vedi tabella I

L'analisi della varianza di questi dati ha indicato che nei riceventi normali e timectomizzati il \log_2 del titolo di agglutinine è una funzione lineare del \log_2 della dose di cellule trapiantate, che i coefficienti delle due regressioni sono significativamente diversi da zero ed uguali tra loro, e che la risposta nei normali non è diversa da quella nei timectomizzati. I risultati del secondo esperimento sono illustrati dalla tabella V che mostra la risposta secondaria di cellule di milza trapiantate in dosi diverse in topi normali e timectomizzati.

TABELLA V - Risposta secondaria di varie dosi di cellule spleniche immunizzate ristimolate con antigene al tempo del trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi		cellule spleniche ($\times 10^6$)			
irradiati		3	6	12	24
Normali		3.9	5.3	6.5	7.5
		0.7	0.3	0.4	0.4
		12	21	22	20
Timectomizzati		4.5	6.1	7.7	8.6
		0.4	0.5	0.4	0.4
		18	18	24	23

Vedi tabella I

L'analisi della varianza di questi dati ha mostrato che nei riceventi normali e timestomizzati il \log_2 del titolo di agglutinine è una funzione lineare del \log_2 della dose di cellule trapiantate, che i coefficienti delle due regressioni sono significativamente diversi da zero ed uguali tra loro, e che la risposta nei timestomizzati non è inferiore a quella nei normali. I risultati di questi esperimenti dimostrano che quando si trapiantano cellule stimulate dall'antigene la risposta primaria o secondaria non è diminuita dalla timestomia. Compatibili con questa osservazione sono anche i risultati di un esperimento in cui cellule midollari o spleniche provenienti da donatori immunizzati sono state iniettate a topi normali e timestomizzati, e ristimate 60 giorni dopo il trapianto. I dati sono riportati nella tabella VI dove si osserva che l'effetto della timestomia sulla risposta secondaria è inapprezzabile per le cellule spleniche ed è evidente per le cellule midollari.

Per queste, tuttavia, l'effetto è molto meno marcato di quello osservato quando il trapianto midollare è costituito prevalentemente da cellule PC_0 (vedi tabella III)

TABELLA VI - Risposta secondaria di cellule midollari e spleniche immunizzate ristimolate con antigene 60 giorni dopo trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi	Midollo		Milza
irradiati	2×10^6	20×10^6	5×10^6
Normali	6.9	7.2	5.5
	0.2	0.2	0.2
	21	24	29
Timectomizzati	3.5	5.3	4.7
	0.5	0.6	0.4
	18	18	18

Vedi tabella I

E' noto che la risposta di tessuti emopoietici fetali trapiantati in topi irradiati è timo-dipendente, e che la concentrazione di cellule potenzialmente competenti nella milza aumenta fino a 10 mesi di età e diminuisce successivamente. Si è voluto analizzare la timo-dipendenza di cellule spleniche provenienti da donatori di età diversa per studiare la variazione di cellule PC_1 nella milza in funzione dell'età. A tale scopo, 5×10^6 cellule di milza di donatori di 10-120 giorni di età sono state trapiantate in topi normali e timectomizzati, e stimulate con G.R.M. 60 e 66 giorni dopo il trapianto. Le risposte primaria e secondaria sono riportate nella tabella VII, dove si osserva che il grado di timo-indipendenza delle cellule spleniche provenienti da topi adulti (vedi tabella III) viene raggiunto all'età di 60 giorni e permane invariato fino a 120 giorni. Lo studio di età successive è in corso.

TABELLA VII - Risposta primaria (I) e secondaria (II) di 5×10^6 cellule spleniche normali provenienti da donatori di diversa età, stimulate con antigene 60 e 66 giorni dopo trapianto in topi normali e timectomizzati.

Riceventi irradiati	Giorni di età dei donatori di cellule spleniche											
	10		30		60		90		120			
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II		
Normali	6.3	8.2	6.7	7.4	7.3	7.3	7.1	8.0	6.8	8.6		
	0.3	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1		
	20	19	12	13	18	17	37	36	19	19		
Timectomizzati	2.2	3.4	2.0	4.2	3.8	6.9	3.8	7.1	3.7	7.3		
	0.4	0.5	0.5	0.5	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.3		
	23	22	14	17	17	17	36	36	19	19		

Vedi tabella I.

Sono stati condotti esperimenti di ritrapianto per testare l'ipotesi secondo cui l'azione del timo consisterebbe nel promuovere la differenziazione delle cellule PC_0 a PC_1 . Scopo della ricerca era quello di determinare la differenza in timo-dipendenza tra cellule di comune origine midollare, dopo essere state coltivate in vivo in presenza o assenza di timo. Cellule di midollo normale sono state iniettate a due gruppi di riceventi, normali e timectomizzati, immediatamente dopo panirradiazione degli animali con 800 R. I topi dei due gruppi sono stati sacrificati un mese dopo il trapianto di midollo. Linfonodi, milza, e midollo sono stati prelevati e dissociati in sospensioni cellulari, separatamente per ciascun gruppo e tessuto. Ciascuna sospensione cellulare è stata iniettata ad una seconda serie di riceventi normali e timectomizzati, immediatamente dopo panirradiazione con 800 R. Una piccola dose di cellule di midollo normale è stata aggiunta all'inoculo di linfonodi per assicurare la sopravvivenza dei riceventi. Tutti i riceventi della seconda serie sono stati iniettati con G.R.M. a 60 e 66 giorni dall'irradiazione e salassati 6 giorni dopo ciascuna iniezione di antigene per la titolazione della risposta primaria e secondaria delle cellule trapiantate. La timo-dipendenza della risposta immunitaria di cellule derivate da ciascun tessuto è stimata dalla differenza tra i \log_2 del titolo dei riceventi normali e timectomizzati. Maggiore la differenza, maggiore il grado di timo-dipendenza. I risultati sono riportati nella tabella VIII.

TABELLA VIII - Timo-dipendenza (\bar{d}) della risposta primaria (I) e secondaria (II) di cellule prelevate da tessuti di riceventi intermedi e stimolate con antigene 60 e 66 giorni dopo il trapianto in topi normali e timectomizzati.

:=====:													
: Inoculo iniziale :		: M i d o l l o :						: n o r m a l e :					
:-----:													
: Ricevente intermedio:		: N o r m a l e :						: T i m e c t o m i z z a t o :					
:-----:													
: Tessuto intermedio :		: Linfonodi :		: Milza :		: Midollo :		: Linfonodi :		: Milza :		: Midollo :	
:-----:													
: Risposta :		: I :	: II :	: I :	: II :	: I :	: II :	: I :	: II :	: I :	: II :	: I :	: II :
:-----:													
: \bar{d} :		: 2.29 :	: 1.83 :	: 3.60 :	: 3.63 :	: 4.48 :	: 5.29 :	: 5.09 :	: 6.38 :	: 4.72 :	: 6.53 :	: 5.29 :	: 5.95 :
: $s_{\bar{d}}$:		: 0.36 :	: 0.45 :	: 0.25 :	: 0.35 :	: 0.16 :	: 0.52 :	: 0.28 :	: 0.46 :	: 0.16 :	: 0.37 :	: 0.23 :	: 0.49 :
: n_N :		: 27 :	: 22 :	: 26 :	: 23 :	: 28 :	: 25 :	: 22 :	: 17 :	: 31 :	: 32 :	: 37 :	: 31 :
: n_T :		: 30 :	: 18 :	: 31 :	: 21 :	: 27 :	: 21 :	: 31 :	: 27 :	: 27 :	: 27 :	: 35 :	: 24 :
:-----:													
:=====:													

\bar{d} = media delle differenze tra la media dei \log_2 dei titoli dei normali e il \log_2 del titolo di ciascun timectomizzato; $s_{\bar{d}}$ = errore standard;

n_N = numero di riceventi normali ; n_T = numero di riceventi timectomizzati.

La varianza delle differenze è stata analizzata in una classificazione gerarchica a due livelli : riceventi intermedi e tessuti intermedi. Per la risposta primaria i risultati dell'analisi sono indicati nella tabella IX, dove la differenza in timo-dipendenza tra i diversi tessuti risulta significativa e maggiore di quella tra riceventi intermedi.

TABELLA IX - Analisi della varianza della timo-dipendenza della risposta primaria

Origine della variabilità	G.L.	Devianza	Varianza	F	P
Fra riceventi	1	120.34	120.34		
Fra tessuti entro ricevente	4	74.47	18.62	6.46	0.05
Fra tessuti	5	194.81	38.96		
Entro tessuti	175	339.84	1.94	20.08	0.005
Totale	180	534.65			

Per testare la significatività della differenza in timo-dipendenza tra il pool dei tessuti derivati da riceventi intermedi timectomizzati, si è applicato alle differenze della tabella VIII il test di Scheffè, utilizzando l'errore sperimentale ottenuto nell'analisi della varianza. Il test di Scheffé presentato nella tabella X indica che la differenza in timo-dipendenza tra i due pools di tessuti è altamente significativa e dovuta principalmente ai linfonodi.

TABELLA X - Test di Scheffé per la timo-dipendenza della risposta primaria

C o n t r a s t o		Differenza sperimentale	Diff. 5 %	Signif. 1 %
T (Linfonodi + milza + midollo) - N (Linfonodi + milza + midollo)		4.73	2.06	2.41
T (Linfonodi) - N (Linfonodi)		2.80	1.16	1.36
T (Milza) - N (Milza)		1.12	1.23	1.44
T (Midollo) - N (Midollo)		0.81	1.23	1.44

T = ricevente intermedio timectomizzato; N = ricevente intermedio normale

La risposta secondaria è stata sottoposta allo stesso tipo di analisi della varianza e i risultati sono riportati nella tabella XI.

TABELLA XI - Analisi della varianza della timo-dipendenza della risposta secondaria

Origine della variabilità	G.L.	Devianza	Varianza	F	P
Fra riceventi	1	234.97	234.97		
Fra tessuti				10.15	0.05
entro riceventi	4	120.61	30.15		
Fra tessuti	5	355.58	71.12	15.52	0.005
entro tessuti	132	605.17	4.58		
Totale	137	960.75			

I risultati dell'analisi della risposta secondaria confermano e mettono in maggiore evidenza quanto osservato per la risposta primaria. La differenza in timo-dipendenza tra riceventi intermedi è significativa anche se si considera la variabilità tra tessuti. Il test di Scheffé riportato nella tabella XII stabilisce la significatività della differenza in timo-dipendenza tra i due pools di tessuti e indica che tale differenza è dovuta ai linfonodi e alla milza.

TABELLA XII - Test di Scheffé per la timo-dipendenza della risposta secondaria

Contrasto	Differenza Sperimentale	Diff. 5%	Signif. 1%
T (Linfonodi + milza + midollo) - N (Linfonodi + milza + midollo)	8.11	3.75	4.40
T (linfonodi) - N (linfonodi)	4.55	2.26	2.65
T (milza) - N (milza)	2.90	2.12	2.49
T (midollo) - N (midollo)	0.66	2.12	2.49

Vedi tabella X

I risultati dell'esperimento di ritrapianto permettono di concludere che le cellule di midollo osseo, PC₀ o timo-dipendenti, possono acquisire timo-indipendenza se coltivate in vivo per un mese in presenza di timo. Le cellule timo-indipendenti originate dalle PC₀ in cultura si distribuiscono principalmente ai linfonodi e alla milza.

Lavori pubblicati dal 1963 al 1965

1) DORIA G.

Identification of the immune system responsible for the specificity of actively acquired tolerance in mice.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49: 281, 1963.

2) DORIA G.

Development of homotransplantation antigens in mouse hemopoietic tissues.
Transplantation 1: 311, 1963.

3) DORIA G.

Iso-antigénicité des cellules embryonnaires chez la souris.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 8: 861, 1963.

4) DORIA G.

An experimental analysis of the specificity of actively acquired tolerance in mice. Simposio Intern. sugli Omo innesti, Padova, 6, 7, 8 maggio, 1963, Ed. Piccin, Padova p. 83.

5) DORIA G.

Studies on the ontogeny of transplantation antigens in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci. 114: 442, 1964.

6) DORIA G.

Studies on the tolerance the immune system of mouse chimeras.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 120: 225, 1964.

7) GENGOZIAN N., DORIA G.

Allotypic specificities in four strains of inbred mice as revealed by reciprocal immunization.

J. Immunol. 93: 426, 1964.

8) AGAROSI G., DORIA G.

Hemo-agglutinin response of isologous spleen cells in irradiated mice thymectomized in adult life.

In: la greffe de cellules hématopoiétiques allogéniques.

Colloque Int. du C.N.R.S., Paris 1964, p.109.

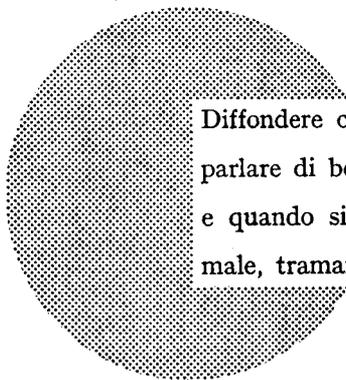
AVVISO AI LETTORI

Tutte le relazioni Euratom sono segnalate, a mano a mano che vengono pubblicate, nel periodico mensile **EURATOM INFORMATION**, edito dal Centro di Informazione e Documentazione (CID). Per abbonamenti (1 anno : Lit. 9.450) e richieste di numeri di saggio, rivolgersi a :

Handelsblatt GmbH
"Euratom Information"
Postfach 1102
D-4 Düsseldorf (Germania)

oppure a

Office de vente des publications
des Communautés européennes
2, Place de Metz
Luxembourg



Diffondere cognizioni equivale a diffondere benessere — intendo parlare di benessere generale e non già di ricchezza individuale — e quando si instaura il benessere va sempre più scomparendo il male, tramandatoci da un oscuro passato.

Alfred Nobel

UFFICI DI VENDITA

Tutte le relazioni Euratom si vendono nei seguenti uffici ai prezzi indicati a tergo della prima pagina della copertina (all'atto dell'ordinazione, indicare chiaramente il riferimento EUR e il titolo della relazione che figurano sulla prima pagina della copertina).

OFFICE CENTRAL DE VENTE DES PUBLICATIONS DES COMMUNAUTES EUROPEENNES

2, place de Metz, Luxembourg (Compte chèque postal N° 191-90)

BELGIQUE — BELGIË

MONITEUR BELGE
40-42, rue de Louvain - Bruxelles
BELGISCH STAATSBAD
Leuvenseweg 40-42, - Brussel

LUXEMBOURG

OFFICE CENTRAL DE VENTE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
9, rue Goethe - Luxembourg

DEUTSCHLAND

BUNDESANZEIGER
Postfach - Köln 1

NEDERLAND

STAATSDRUKKERIJ
Christoffel Plantijnstraat - Den Haag

FRANCE

SERVICE DE VENTE EN FRANCE
DES PUBLICATIONS DES
COMMUNAUTES EUROPEENNES
26, rue Desaix - Paris 15°

ITALIA

LIBRERIA DELLO STATO
Piazza G. Verdi, 10 - Roma

UNITED KINGDOM

H. M. STATIONERY OFFICE
P. O. Box 569 - London S.E.1

EURATOM — C.I.D.
51-53, rue Belliard
Bruxelles (Belgique)