

50376  
1973  
119

N° d'ordre : 384

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376  
1973  
119

3° Cycle

---

# THESE

présentée

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR EN BIOLOGIE CELLULAIRE

par

### Marie-Noël VLAEMINCK



## ETUDE EXPERIMENTALE SUR ŒUF DE POULE EMBRYONNE ET EN CULTURES ORGANOTYPIQUES DE LA DIFFUSION DES TUMEURS MALIGNES

---

soutenu le 25 Juin 1973, devant la Commission d'examen

M. M. DURCHON, *Président*

M. A. CAPURON, *Rapporteur*

MM. L. ADENIS et G. BISERTE, *Membres invités*

# S O M M A I R E

-----

pages

## I N T R O D U C T I O N

Choix des méthodes et problèmes posés

## G E N E R A L I T E S

### 1 - HISTORIQUE DES TRAVAUX EFFECTUES A L'AIDE DE LA METHODE D'INOCULATION PAR VOIE INTRAVEINEUSE CHEZ L'EMBRYON DE POULET

1.1 - Technique 6

1.2 - Divers types de tumeurs utilisées

1.2.1 - Tumeurs aviaires

1.2.2 - Tumeurs humaines

1.2.3 - Tumeurs de mammifères 7

1.2.3.1 - Tumeurs solides

1.2.3.2 - Tumeurs ascitiques 8

### 2 - LA CULTURE ORGANOTYPIQUE : REVUE DE LA LITTERATURE

2.1 - Composition du milieu de culture 12

2.2 - Les associations hétérogènes

2.3 - Associations xénoplastiques d'organes  
embryonnaires d'oiseaux et de tumeurs 13

2.3.1 - Associations d'organes d'embryons  
de poulet à des tumeurs malignes  
de mammifères

2.3.2 - Culture organotypique in vitro de  
néoplasmes malins humains 14

3 - ANALYSE BIOCHIMIQUE DES SUBSTANCES FAVORABLES A LA CROISSANCE DES TUMEURS IN VITRO	
3.1 - Méthode d'étude	15
3.2 - Résultats obtenus	16

#### 4 - RAPPEL EMBRYOLOGIQUE

4.1 - Système circulatoire embryonnaire	18
4.1.1 - La chorio-allantoïde	
4.1.2 - Principaux vaisseaux de la circulation sanguine	19

### EXPERIMENTATION

#### 1 - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DIFFUSION METASTATIQUE IN VIVO

1.1 - Technique d'injection par voie intraveineuse	
1.1.1 - Matériel expérimental	
1.1.1.1 - Genre et espèce utilisé	20
1.1.1.2 - Tumeur utilisée	
1.1.1.3 - Appareillage	21
1.1.2 - Méthode d'inoculation	
1.1.3 - Examen microscopique des organes	21
1.1.3.1 - Observation en microscopie photonique	22
1.1.3.2 - Observation en microscopie électronique	23
1.2 - Constatations expérimentales	
1.2.1 - Evolution générale des embryons après inoculation	
1.2.2 - Aspects macroscopiques	23

1.2.3 - Aspects microscopiques des métastases viscérales	24
1.2.4 - Répartition des foyers tumoraux dans les viscères	25
1.3 - Etude en microscopie photonique des métastases dans la membrane chorio-allantoïdienne	26
1.4 - Aspects ultrastructuraux au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne	28
1.4.1 - Rapports entre les cellules tumorales et les membranes basales non vasculaires	
1.4.2 - Rapports entre les cellules tumorales et les capillaires	29
1.5 - Inoculation par voie intracoelomique de l'embryon de poulet de 3 jours	29
1.5.1 - Méthode	
1.5.2 - Résultats	
1.5.2.1 - Sacrifice entre le 5e et le 7e jour	30
1.5.2.2 - Sacrifice au 14e jour	
1.6 - Interprétation des résultats	31
2 - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DIFFUSION METASTATIQUE IN VITRO	35
2.1 - Technique de culture organotypique	
2.1.1 - Origine des explants	
2.1.1.1 - Organes embryonnaires	
2.1.1.2 - La tumeur	36

2.1.2 - Technique de culture	
2.1.2.1 - Préparation du milieu de culture	
2.1.2.2 - Technique d'explantation	37
2.1.3 - Examen microscopique des organes	
2.1.4 - Méthode statistique	
2.2 - Comportement de la tumeur d'Ehrlich associée à du foie et de la rate embryonnaires de poulet	38
2.2.1 - Culture de la tumeur d'Ehrlich	
2.2.2 - Associations hépatique et tumorale	39
2.2.2.1 - Aspect histologique des explants	
2.2.2.2 - Résultats numériques	40
2.2.2.3 - Conclusions	41
2.2.3 - Associations splénique et tumorale	41
2.3 - Comportement de la tumeur d'Ehrlich associée à d'autres viscères de l'embryon de poulet	43
2.3.1 - Associations de mésonéphros et de tumeur d'Ehrlich	43
2.3.2 - Associations de poumon et de tumeur d'Ehrlich	45
2.3.3 - Associations de bourse de Fabricius et de tumeur d'Ehrlich	46
2.4 - Comportement de certaines associations séparées par un filtre millipore	48
2.4.1 - Méthode	
2.4.2 - Résultats	49

2.4.3 - Etude au microscope électronique des filtres	50
2.5 - Interprétation des résultats	51
3- ESSAIS PRELIMINAIRES DE CULTURE DES FRAGMENTS TUMORAUX EN PRESENCE D'EXTRAITS DES DIFFERENTS ORGANES	53
3.1 - Préparation des extraits totaux	
3.1.1 - Méthode	
3.1.2 - Résultats	54
3.2 - Préparation des fractions purifiées	55
DISCUSSION GENERALE	56
CONCLUSION	62
BIBLIOGRAPHIE	- 73 références -
ICONOGRAPHIE	- 16 planches hors texte - - 7 figures situées res- pectivement pages 19 ; 21 ; 22 ; 29 ; 37 ; 26 ; 55 .

## I N T R O D U C T I O N

Le terme de METASTASE désigne d'une façon générale la reproduction à distance, à partir d'un foyer primitif, d'un processus morbide par le transport de l'agent causal dans les conduits et cavités naturelles de l'organisme . L'abcès métastatique au cours d'une septicémie illustre cette définition . Mais en fait, l'usage réserve l'utilisation de ce terme au seul processus cancéreux . La signification de ce terme a également quelque peu changé puisque les métastases sont des colonies de cellules cancéreuses provenant d'un cancer pré-existant ou coexistant qui se développent à distance de ce cancer en présentant avec lui une identité constante de ses caractères morphologiques et biologiques . Il est bien évident alors que ce n'est pas l'agent causal qui est transporté à distance, mais la cellule cancéreuse en migration dans l'organisme, comme si elle était un véritable germe.

Ainsi défini, ce phénomène apparaît posséder une importance fondamentale . Il constitue après la cancérisation, le processus le plus significatif dans l'évolution du cancer . Dans l'histoire naturelle de ce sujet extrêmement vaste, le développement des foyers métastatiques proprement dits représente l'étape évolutive finale . La diffusion de cellules tumorales à grande distance de la tumeur primitive, c'est à dire l'infiltration des organes par métastases comporte plusieurs étapes : pénétration des cellules cancéreuses dans le système circulatoire, sanguin ou lymphatique, embolisation des cellules cancéreuses transportées et qui finalement s'arrêtent au niveau des vaisseaux des organes pour se multiplier et donner naissance à des colonies secondaires .

Pendant longtemps les propriétés fondamentales des cellules cancéreuses furent tenues pour seules responsables du développement des tumeurs malignes depuis l'apparition du foyer initial jusqu'à l'efflorescence métastatique terminale .

Depuis plusieurs années cependant, il apparaît de plus en plus évident que l'évolution du processus tumoral est conditionnée non seulement par les propriétés des cellules cancéreuses, mais en outre par le comportement immunologique de l'hôte vis-à-vis de la tumeur qu'il héberge et peut être, pensons nous, par le terrain local que représentent les organes, ce qui imprime au développement du processus des physionomies particulières selon les cancers et selon les individus et rend compte ainsi de l'inégalité de ceux-ci devant l'affection .

C'est dire tout l'intérêt qui s'attache à l'étude de ce sujet, tant dans l'ordre fondamental qu'appliqué . Malheureusement, l'approche expérimentale du phénomène de la diffusion métastatique est très délicate et les techniques proposées ne sont pas toujours exemptes de critiques . Des recherches dans ce domaine ont été effectuées dans notre Institut : elles concernent l'étude de la dissémination et du sort dans l'organisme de cellules cancéreuses injectées directement dans le torrent circulatoire ; puis la détermination de certaines conditions biologiques qui président à la diffusion métastatique des tumeurs malignes chez les animaux inoculés . Evidemment, les foyers tumoraux obtenus ne sont pas véritablement des métastases puisqu'il n'y a pas de tumeur primitive chez l'animal utilisé . Toutefois, afin de pouvoir observer le phénomène dans des conditions reproductibles, nous avons été obligés d'utiliser cette technique .

Nous nous sommes proposés, dans un premier travail de compléter les recherches initiales ( ADENIS, 1962 ; DRIESSENS et al., 1960, 1961, 1962, 1963 a, b, c, 1964, 1965 a, b, 1966 ; VANLERENBERGHE et al., 1965 ), en utilisant un système expérimental particulier puisqu'il s'agit de l'oeuf de poule embryonné, inoculé par voie intravasculaire à l'aide de cellules tumorales hétérologues . L'interaction de celles-ci vis-à-vis de l'embryon de poule ne présente pas un inconvénient majeur, car il y a tout lieu de penser qu'au moment de l'inoculation l'oeuf de poule embryonné, bien que possédant des anticorps maternels dans son sac vitellin

( MÖLLER, 1964 ; READE et al., 1965 ), est encore "incompétent" sur le plan immunologique ( GREEN et LORINCZ, 1956, 1957 ; MURPHY, 1913 ; POLK et al., 1938 ; ROUS et MURPHY, 1911 ) .

Pour l'étude de la diffusion métastatique, le modèle expérimental que nous avons choisi, présente un double intérêt :

→ d'une part, celui d'accepter la greffe hétérologue comme nous venons de le préciser . Il est en effet parfaitement connu que l'organisme animal réagit à l'introduction d'implants hétérologues par leur rejet . Afin d'éviter ce mécanisme, il est alors nécessaire d'injecter des immunosuppresseurs ou de pratiquer une thymectomie néonatale . Au contraire, l'oeuf de poule embryonné se révèle immunologiquement inerte et ne requiert aucun conditionnement : cela correspondrait à son état d'immaturité .

→ d'autre part, celui de permettre une étude précise de la dissémination vasculaire et de la croissance des cellules cancéreuses au niveau des organes à l'aide d'un inoculat demeuré typique ( LEIGHTON, 1967 ) .

Ainsi, l'oeuf de poule embryonné auquel nous inoculons des cellules tumorales d'Ehrlich par voie intraveineuse chorio-allantoïdienne nous a semblé constituer un matériel intéressant pour étudier l'invasion tumorale examinée à l'échelle microscopique et ultrastructurale et établir la répartition viscérale des foyers métastatiques . Ayant éliminé l'action des facteurs immunologiques, par l'emploi du système expérimental que nous avons défini, il convenait d'essayer d'apporter une explication à la localisation " sélective " des foyers métastatiques au niveau des organes, établie par certains auteurs et que nous avons nous-mêmes remarquée ( EASTY et al., 1969 ; LEIGHTON et al., 1967 ; MENKES et al., 1965 ; VLAEMINCK et al., 1970, 1971 ; DRIESSENS et al., 1963 )

Sur la base de nos premières constatations effectuées in vivo, dans le but de démontrer qu'à côté des facteurs vasculaires, le terrain local joue un rôle non négligeable, nous avons étudié le comportement de la tumeur d'Ehrlich vis-à-vis des organes embryonnaires du poulet, hors de l'organisme, en culture organotypique affrontée selon WOLFF ( 1952 ) . Par là même nous voulons vérifier si dans ces conditions les cellules cancéreuses présentent une affinité préférentielle pour un organe donné . La méthode de culture organotypique employée, nous a paru offrir un excellent moyen expérimental pour apprécier si un organe se révèle plus apte qu'un autre au développement et à la multiplication de cellules cancéreuses d'une variété donnée . En effet, aucun dispositif ne semble plus favorable à l'étude du pouvoir d'invasion des cellules cancéreuses que les associations in vitro d'organes embryonnaires et de tumeurs . A l'aide de cette technique, où l'organe normal et la tumeur maligne se confrontent directement, les facteurs circulatoires n'interviennent pas ni l'influence des conditions organiques normales . Nous avons donc affaire à un système tissulaire où toute réaction de défense spécifique et tout particulièrement immunologique est éliminée . Dans ces conditions, la possibilité de clarifier le problème de la prédominance métastatique apparaît comme tout à fait réelle .

Pour corroborer l'hypothèse d'un véritable " tropisme " qui entraîne les cellules cancéreuses vers tel organe préférentiel, en rapport avec le rôle du terrain local dans la localisation des métastases, nous avons refait les mêmes expériences, en interposant cette fois un filtre millipore entre les fragments embryonnaires et la tumeur d'Ehrlich .

En dernier lieu, afin d'essayer de préciser les facteurs exacts responsables de cette migration préférentielle, nous avons abordé l'étude du comportement des fragments tumoraux en présence d'extraits des différents organes, en tenant compte notamment des observations effectuées par WOLFF et al., ( 1968 ) .

En effet le rôle des constituants qui peuvent être extraits des organes propices ou non au développement des nodules tumoraux, reste encore à établir . La mise en évidence de telles relations apparaît pourtant primordiale dans la compréhension du mécanisme de l'invasion tumorale et constitue un des aspects de notre travail.

En préface à nos travaux, nous avons résumé les connaissances actuelles ayant trait à l'invasion des organes de l'embryon de poulet par les cellules cancéreuses in vivo et in vitro ainsi que les facteurs mis en cause . Enfin, nous avons pensé qu'il était utile de rappeler certaines étapes du développement embryologique du poulet .

## G E N E R A L I T E S

Dans ce chapitre, nous rappelons brièvement les différents travaux effectués à l'aide des méthodes que nous avons utilisées dans notre travail et donnons quelques indications concernant le développement embryologique du poulet .

1 - HISTORIQUE DES TRAVAUX EFFECTUES A L'AIDE DE LA METHODE  
D'INOCULATION PAR VOIE INTRAVEINEUSE CHEZ L'EMBRYON DE  
POULET .

1.1 - Technique

La technique classique d'inoculation par voie intraveineuse fut élaborée par POLK et al., ( 1938 ) et par EICHORN ( 1940 ) . LEE et al., ( 1947 ), se proposent d'en préciser les possibilités d'application et analysent les divers facteurs susceptibles de tuer l'embryon au cours de l'opération ( âge de l'embryon, volume injecté, vitesse d'injection, lésions organiques ) .

1.2 - Divers types de tumeurs utilisées

1.2.1 - Tumeurs aviaires

Des cellules du sarcome de Rous de la poule sont injectées chez l'embryon de poulet par KARNOFSKY et al., ( 1952 ) , mais aucun foyer tumoral n'est mis en évidence chez les animaux inoculés.

1.2.2 - Tumeurs humaines

THIERSCH ( 1944 ), inocule par voie intraveineuse une leucémie myéloïde humaine à des embryons de poulet . Cinq des douze animaux inoculés développent six mois plus tard une ostéopathie, mais celle-ci ne fut pas considérée comme une lésion spécifique due à la leucémie, encore que cela soit discutable .

BENDER et al., ( 1949 ) injectent des broyats de tumeurs cérébrales dont les métastases se localisent uniquement dans le foie. Le pourcentage de " prises " de ces tumeurs est faible ( 9,6% ) .

### 1.2.3 - Tumeurs de mammifères

Les expérimentateurs ont utilisé des tumeurs solides et, dans ce cas, les cellules sont isolées de la tumeur par broyage puis mises en suspension ainsi que des tumeurs liquides sous forme ascitique où la dispersion cellulaire peut être assimilée à la migration des cellules tumorales à partir d'une tumeur primitive .

#### 1.2.3.1 - Tumeurs solides

BENDER et al., ( 1949 ), essayent de transplanter des tumeurs animales hétérologues dans le système circulatoire de l'embryon de poulet . La fréquence du développement tumoral ainsi obtenu 10 jours plus tard varie avec le type de tumeur employé : elle oscille de 0% avec le carcinome mammaire de la souris C3H à 18% avec le sarcome transplantable de la souris C57 . Le foie et le cerveau sont dans ce cas précis, le lieu des métastases les plus importantes et les plus nombreuses .

La leucémie murine P 388, injectée par voie intraveineuse chez l'embryon de poulet, manifeste une prédisposition à se développer au niveau du cerveau où la prolifération des cellules leucémiques peut se poursuivre après l'éclosion ( CLARKSON, 1964 ) .

EASTY et al., ( 1969 ), se proposant de déterminer les facteurs responsables des variations de la vitesse de croissance des différentes tumeurs au contact des tissus de l'embryon de poulet, entreprennent une étude comparative de la croissance de cellules tumorales provenant de rats, de souris et de hamsters après les avoir injectées dans la veine chorioallantoïdienne au 11e jour d'incubation . Ils mettent en évidence que les tumeurs étudiées peuvent être réparties en deux groupes distincts, sur la base de leur capacité de croissance :

- les tumeurs ayant perdu leur spécificité de lignée dans l'espèce de leur hôte d'origine, croissent vigoureusement dans plusieurs organes de l'embryon et sur les annexes embryonnaires .

- au contraire, les tumeurs ayant conservé leur spécificité de lignée ne croissent pas dans aucun organe, excepté le cerveau, même avec le maximum d'inoculat toléré .

L'explication de tels faits demeure encore hypothétique et c'est un point sur lequel nous reviendrons .

En définitive, les auteurs ont pu mettre en évidence que le siège des foyers métastatiques est variable selon le type de tumeur injecté . Néanmoins, le foie et le mésonéphros furent le site préférentiel de métastases volumineuses dans de nombreux cas . La rate est généralement indemne, ce qui tend à montrer qu'il n'y a pas uniquement en jeu des facteurs mécaniques . Nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir sur ce problème .

Par ailleurs, ils montrent qu'un traitement préalable des embryons à la cortisone, aux rayons X, au propionate de testostérone ou bien encore à la L-Asparaginase ne modifie pas de façon significative la croissance des tumeurs greffées . Ces divers facteurs ne semblent donc pas intervenir sur le terrain étudié .

#### 1.2.3.2 - Tumeurs ascitiques

GREEN et al., ( 1956 ) étudient la diffusion métastatique en injectant par voie intraveineuse des cellules de la tumeur Krebs-2 . Une importante dissémination tumorale est observée, mais uniquement dans le foie et le cerveau . Le développement de cette tumeur dépend surtout du nombre de cellules injectées, comme cela est classique .

HUMPHREYS ( 1960 ) observe que le comportement des cellules ascitiques d'Ellich injectées par voie intraveineuse à des embryons de poulet est différent selon le jour d'incubation choisi pour réaliser l'inoculation . Ainsi, la susceptibilité d'invasion par les cellules tumorales de chacun des organes varie selon l'âge et le stade de développement de l'embryon au moment de l'injection :

- les embryons âgés de 9 jours, qui reçoivent un nombre défini de cellules tumorales, ont leurs tissus rapidement infiltrés . Après quelques jours, le nombre des cellules tumorales diminue dans les organes sélectivement colonisés, excepté le cerveau et le sac vitellin .

- en revanche, les embryons âgés de 12 jours au moment de l'injection, ne présentent jamais ultérieurement de métastases dans leur sac vitellin .

Dans des articles publiés entre 1958 et 1965, MENKES et al., relatent les résultats d'une étude concernant la réaction de l'embryon de poulet vis-à-vis d'une greffe hétérologue . Il ressort de leurs travaux que l'interaction entre l'hôte et les cellules tumorales hétérologues de la tumeur d'Ehrlich introduites dans la circulation sanguine de l'embryon de poulet évolue en fonction du développement embryonnaire de l'organisme . Après une diffusion et une " prise " dans l'organisme, les cellules tumorales passent, au cours de la seconde moitié de l'incubation, par un stade de multiplication marquée, avec formation de nodules tumoraux et infiltration . A mesure que l'on approche de l'éclosion, il se produit une dégénérescence et une nécrose graduelle des cellules tumorales qui se poursuit par une régression complète après l'éclosion . Il s'agit là d'un phénomène de rejet .

Pour toutes les périodes évolutives, il y a une localisation élective des cellules tumorales introduites . Les auteurs ont mis en évidence que dans la première moitié de l'incubation, les cellules tumorales sont localisées de préférence dans le mésenchyme, les surfaces précartilagineuses et les tissus périneuraux ; tandis que dans la seconde moitié, elles prolifèrent dans le mésonéphros, le foie, le coeur et le système nerveux . La rate , les poumons et le néphros au contraire ne semblent pas constituer des terrains favorables au développement des cellules cancéreuses . Une étude comparative de l'invasion du mésonéphros et du métanéphros montre que les différences de capacité proliférative des cellules tumorales hétérologues ne doivent certainement pas être attribuées aux différentes conditions de vascularisation, mais bien plutôt à des

" conditions spécifiques d'organes et de tissus ", comme d'ailleurs nous nous attacherons à le démontrer .

Une masse importante de travaux concernant l'étude de la diffusion métastatique a été effectuée depuis 1963 par LEIGHTON et al. Une partie de ces études est réalisée chez l'oeuf de poule embryonné, inoculé à l'aide de cellules ascitiques de Walker 256 du rat et du sarcome de Yoshida 7974 . La mise en circulation des cellules tumorales dans le courant sanguin des embryons de poulet est suivie, une semaine plus tard, d'une très importante dissémination tumorale avec localisation élective, par ordre décroissant du nombre des foyers tumoraux dans les organes suivants : foie, cerveau, poumons, muscles, coeur et peau .

L'auteur a remarqué que la membrane chorio-allantoïdienne est le site d'importantes métastases, dont il a mis en évidence les détails architecturaux de la colonisation, par l'emploi de méthodes de fixation, de coloration et d'observation sur l'organe extraembryonnaire entier .

Nous avons précédemment cité les travaux de EASTY et al., ( 1969 ) concernant la dissémination de cellules tumorales hétérologues chez l'oeuf de poule embryonné .

Ces auteurs en concluent que, dans le système expérimental choisi, il existe des lieux de prédilection des métastases induites. Bien que le siège des foyers métastatiques soit variable selon le type de tumeur injecté, le foie, le mésonéphros et le cerveau sont les sites de métastases préférentielles et volumineuses dans de nombreux cas . L'explication de cette répartition reste évidemment en partie méconnue, mais un certain nombre d'hypothèses sont émises, qui évoquent :

- premièrement, la mise en jeu de facteurs mécaniques ( EASTY et al., 1969 ) . Il est en effet possible que les cellules tumorales parviennent plus difficilement au niveau de certains organes dont les voies d'accès sont étroites, tels les capillaires pulmonaires .

Toutefois, le repérage des cellules tumorales dans les premières heures qui suivent leur injection, a permis de se rendre compte que la croissance tumorale dans les organes ne correspond pas toujours à la capacité de fixation des cellules néoplasiques par ces organes. Ainsi, les poumons et la rate " captent " une grande partie des cellules inoculées mais les foyers tumoraux s'y développent peu ou pas du tout, dans le système expérimental considéré .

- deuxièmement, la spécificité de lignée des tumeurs inoculées ( EASTY et al., 1969 ) . Cette hypothèse est en relation avec la notion de récepteurs isoantigéniques de la surface cellulaire tumorale, introduite par MÖLLER ( 1964 ) et EASTY ( 1969 ) . Ces antigènes pourraient réagir avec les anticorps maternels naturels issus du sac vitellin de l'embryon . La croissance vigoureuse de certaines tumeurs pourrait être attribuée, en partant de ces données, à l'importante histocompatibilité des antigènes vis-à-vis des cellules tumorales ou bien à l'absence de certaines surfaces antigéniques, comme c'est le cas pour la tumeur d'Ehrlich .

- troisièmement, le rôle des conditions spécifiques d'organes et de tissus ( MENKES et al., 1965 ; LEIGHTON et al., 1967 ) .

Le foie et la rate sont deux organes très bien vascularisés et pourtant les fréquences des métastases à leur niveau sont totalement différentes . Il faut donc considérer que certains organes réagiraient différemment pour des raisons anatomiques ou biologiques d'affinité cellulaire mal connues, qui restent encore à préciser .

## 2 - LA CULTURE ORGANOTYPIQUE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

On appelle culture organotypique, la culture d'ensembles organisés qu'il s'agisse d'organes ou de tissus . La méthode de culture s'est beaucoup améliorée à partir de 1952 notamment avec la mise au point par WOLFF et al., d'une technique qui conserve l'intégrité des organes explantés .

## 2.1 - Composition du milieu de culture

L'incorporation des éléments nutritifs dans un substratum non nutritif a été préconisée par WOLFF et HAFEN ( 1952 ) . Ces auteurs ont mis au point une méthode de culture organotypique particulièrement favorable à la croissance des ébauches embryonnaires et à leur différenciation . Cette méthode permet à l'explant, déposé à sec à la surface du milieu gélifié, de conserver son organisation . Les proportions de substances incorporées peuvent être modifiées sans changement de propriétés du milieu . La composition du milieu " standard " de WOLFF et HAFEN ( 1952 ) est la suivante :

Substratum : gel d'agar dans une solution physiologique  
 .... 12 parties

Aliments : extrait d'embryon de poulet + liquide physiologique glucosé ( pouvant être remplacé en partie ou en totalité par du sérum de cheval selon les besoins nutritifs de l'organe )  
 .... 10 parties

Antibiotiques : suivant les besoins, pénicilline, streptomycine à raison de 100 à 200 unités .... 1 partie

Il a été prouvé que la composition de ce milieu à un grand nombre d'espèces animales peut convenir .

## 2.2 - Les associations hétérogènes

La méthode de cultures d'organes embryonnaires in vitro a montré qu'il est possible d'associer des fragments d'organes de même espèce ou d'espèces différentes sans que les cellules d'origine différente ou d'espèce différente ne manifestent d'incompatibilité . Loin de se fuir, les tissus effectuent des échanges et des regroupements entre les cellules d'origine différente, formant de véritables chimères d'organes embryonnaires . Cette collaboration des tissus a conduit WOLFF et al., ( 1961 ) à réaliser des associations d'organes embryonnaires d'oiseaux et de tumeurs malignes .

## 2.3 - Associations xénoplastiques d'organes embryonnaires d'oiseaux et de tumeurs

### 2.3.1 - Associations d'organes d'embryons de poulet à des tumeurs malignes de mammifères .

Des expériences antérieures réalisées in vivo par BUCKER ( 1948 ), suivies de celles de LEVI MONTALCINI et HAMBURGER ( 1951 ), KAUTZ ( 1952 ), de KARNOFSKI ( 1953 ), ont mis en évidence qu'un sarcome de souris S 180 pouvait être explanté in vivo, soit sur les annexes, soit dans le corps même de l'embryon .

Par la suite, le succès des chimères xénoplastiques d'organes embryonnaires homologues ou non, a incité WOLFF et al., ( 1961 ) à tenter l'association in vitro d'organes embryonnaires d'oiseaux à des tumeurs de mammifères . Parmi ces organes, le mésonéphros s'est montré le plus favorable aux cultures de longue durée . De plus, le rein embryonnaire apparaît indispensable à la survie d'un fragment tumoral explanté sur le milieu standard . On s'est aperçu que le milieu utilisé tel qu'il a été composé ci dessus, est impropre à la culture de tumeurs malignes . En revanche, lorsque du mésonéphros de poulet est ajouté au milieu, des fragments tumoraux prolifèrent activement et envahissent le rein embryonnaire . Il s'avère donc que le mésonéphros est indispensable à la nutrition et à la prolifération de l'explant tumoral .

Pour éviter les remaniements de structures périphériques consécutifs à la mise en culture de tissus dénudés, WOLFF et al., ( 1961 ) entourent l'explant tumoral d'une fine membrane anhyste : la membrane vitelline de l'oeuf de poule non incubé . Même dans ces conditions, le néoplasme ne périclite pas . Il y a donc une diffusion au travers de la membrane vitelline, de substances qui permettent ou favorisent la prolifération tumorale .

### 2.3.2 - Culture organotypique in vitro de néoplasmes malins humains

D'une manière identique, des cultures de cellules malignes humaines ( HeLa et KB ) reprennent une croissance et une structure organotypique si elles sont associées aux organes embryonnaires de poulet ( WOLFF et al., 1959, 1961 ) . Les auteurs ont réussi à cultiver depuis plus de sept ans maintenant, deux souches de tumeurs humaines prélevées au cours d'interventions chirurgicales . Il s'agit d'une métastase hépatique d'un adénocarcinome de l'estomac et d'un épithélioma du côlon descendant . Par une technique différente, celle des " éponges celluloses ", LEIGHTON et al., ( 1954 ) obtiennent certaines structures organisées en cultivant des fragments de tumeurs, mais ces cultures sont toujours de courte durée .

En définitive, les travaux relatifs à la culture organotypique in vitro menés tout particulièrement par l'école de WOLFF aboutissent aux résultats suivants :

- La culture in vitro de nodules cancéreux ( humains ou de mammifères ) peut être obtenue par l'association d'explants de tumeurs avec des organes embryonnaires de poulet .

- Il n'est pas nécessaire qu'il y ait contact entre les explants embryonnaire et tumoral ; lorsqu'ils sont séparés par une membrane vitelline d'oeuf de poule non incubé, les observations effectuées sont identiques . Le mode de nutrition parasitaire est donc remplacé par la nutrition osmotique .

- Comparativement aux cultures organotypiques réalisées antérieurement par les autres auteurs, la méthode de WOLFF est la seule à assurer la pérennité des cultures de tumeurs, sans qu'il y ait différenciation structurale .

- Parallèlement, WOLFF et al., ( 1969 ), ont montré que certains acides aminés sont favorables à la prolifération tumorale de certaines souches en culture organotypique de longue durée . Mais ces acides aminés ne représentent certainement pas les seuls facteurs nécessaires à la croissance des tumeurs .

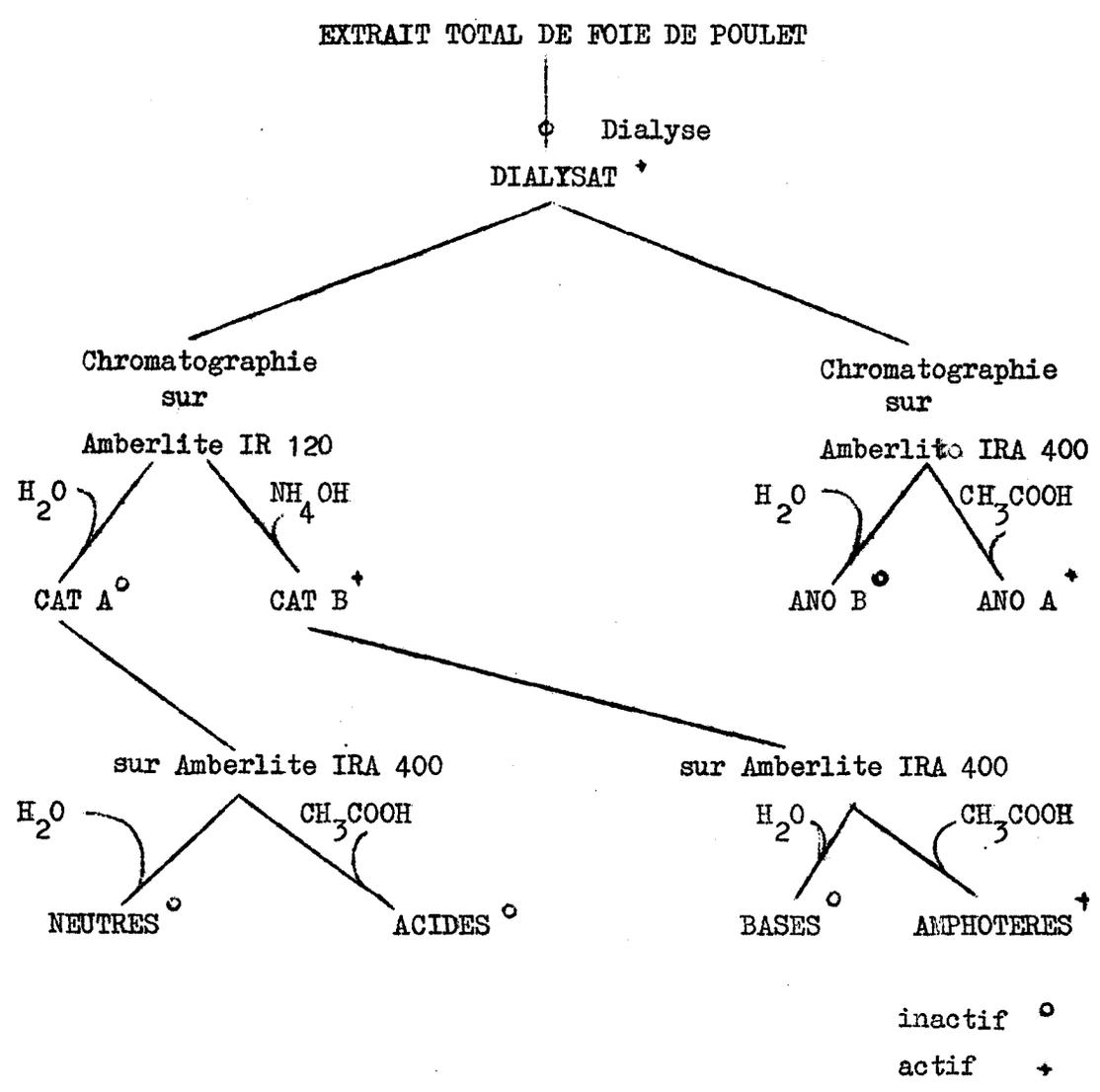
### 3 - ANALYSE BIOCHIMIQUE DES SUBSTANCES FAVORABLES A LA CROISSANCE DES TUMEURS IN VITRO

#### 3.1 - Méthode d'étude

Nous rapportons ici les étapes de l'analyse biochimique des extraits d'organes de poulet, telles que WOLFF et al., ( 1968, 1969 ), les ont réalisées jusqu'à maintenant .

Les premiers travaux dans ce domaine ont consisté à préparer des extraits de mésonéphros et de foie de poulet . Après centrifugation, le surnageant est prélevé et ajouté aux milieux de culture; mais il s'est révélé toxique . Les auteurs ont donc été amenés à réaliser des fractionnements à partir de dialysats d'organes, en particulier du foie de poulet de 3 mois . Cinquante grammes de foie de poulet de 3 mois sont additionnés de 45 ml de solution de Tyrode et 45 ml d'eau déminéralisée ; ils sont ensuite broyés dans un homogénéiseur à couteaux tournant à 40 000 tours/minute durant deux minutes et demi . Ce broyat est dialysé à froid contre un très grand volume d'eau déminéralisée pendant 18 heures, dans des tubes de cellulose Visking . Enfin, le dialysat est ramené au volume initial sous vide, dans un évaporateur rotatif .

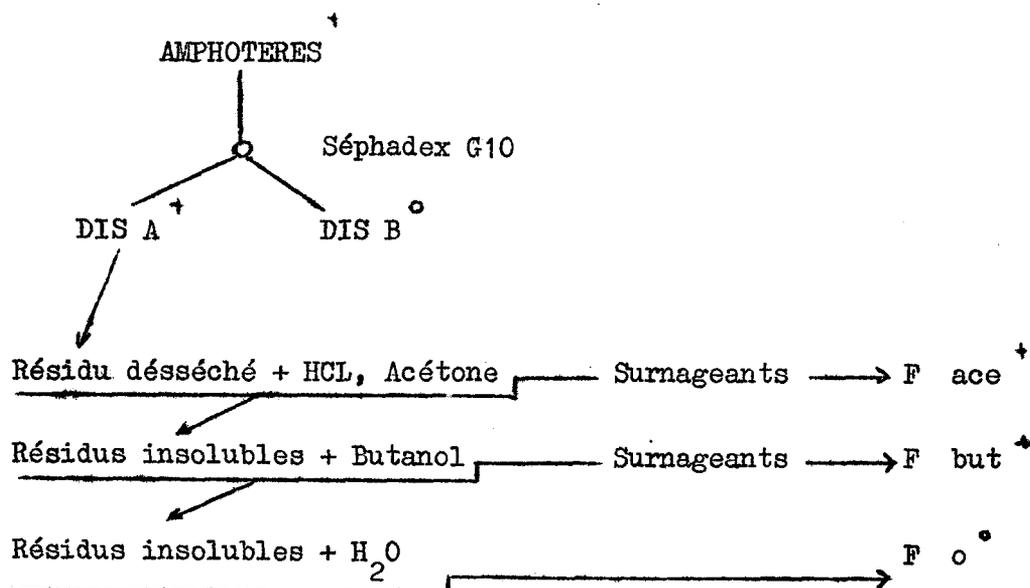
Le fractionnement des dialysats est effectué soit par chromatographie de gel filtration ou par chromatographie sur des résines à pouvoir d'échange ionique, ce que l'on peut résumer de la façon suivante :



### 3.2 - Résultats obtenus

Parmi les 4 fractions qui ont été ainsi séparées, seule la fraction contenant les " ampholites " s'est avérée active . Cette fraction contient notamment de nombreux acides aminés .

Un fractionnement plus poussé de la fraction amphotère, entreprise par WOLFF et al., ( 1969 ), a permis de séparer à nouveau deux fractions , dont une seule est active . Là encore, celle-ci possède de nombreux acides aminés, néanmoins d'autres substances semblent présentes . Le schéma de fractionnement de cette partie active est le suivant :



WOLFF et al., ont montré par une analyse plus approfondie de la fraction active que la concentration des acides aminés présents, est bien plus importante dans les extraits dialysés que dans les milieux constitués pour la culture . Des solutions synthétiques des 18 acides aminés identifiés par la chromatographie, préparées aux concentrations indiquées par l'analyse et ajoutées au milieu de culture, ont permis d'entretenir la croissance des tumeurs .

L'ensemble des résultats obtenus ont conduit WOLFF et al., ( 1972 ) à formuler des conclusions sur le rôle biologique des substances mises en évidence :

- Certains acides aminés sont indispensables et d'autres favorables à la prolifération des souches tumorales humaines en culture organotypique de longue durée . De plus, ils doivent être employés à une concentration beaucoup plus élevée que celle des extraits d'embryons de poulet .

- Il est fort possible que d'autres substances indispensables, de nature inconnue, soient contenues dans l'extrait d'embryons, et dans les dialysats de foie .

- Le rôle du sérum de poulain, indispensable aux cultures, n'est pas élucidé .

Ces conclusions soulignent la complexité du problème de l'adaptation de la tumeur d'un organisme à un milieu de culture . En effet, il est encore à l'heure actuelle impossible de mettre en culture d'emblée, des explants de tumeurs parce que la connaissance des conditions requises est insuffisante .

#### 4 - RAPPEL EMBRYOLOGIQUE

Puisqu'on utilise dans un but ou dans un autre presque tous les tissus et les cavités pendant le développement de l'oeuf de poule embryonné, il paraît utile de donner quelques indications concernant ses membranes extraembryonnaires, le contenu de ses différentes cavités et son système circulatoire .  
( fig. 1 ; 1,2,3 )

##### 4.1 - Système circulatoire embryonnaire

###### 4.1.1 - La chorio-allantoïde

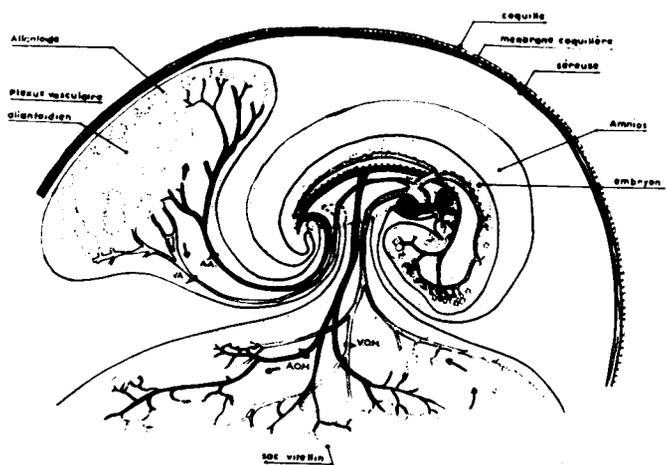
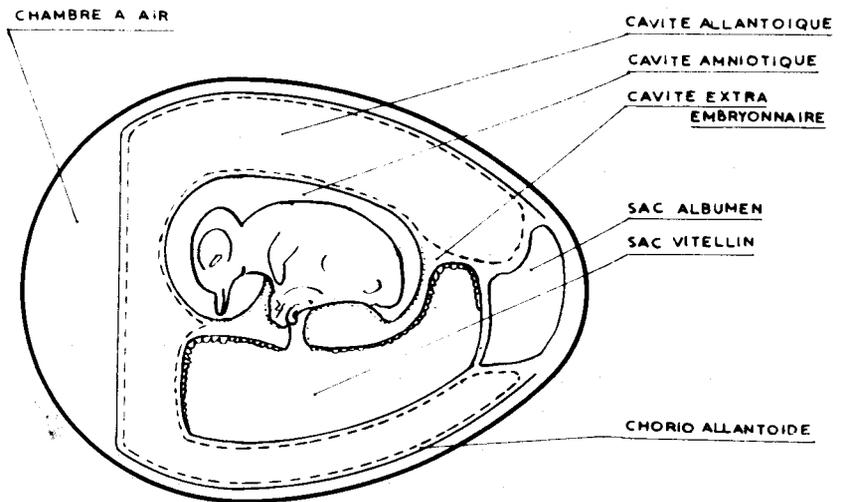
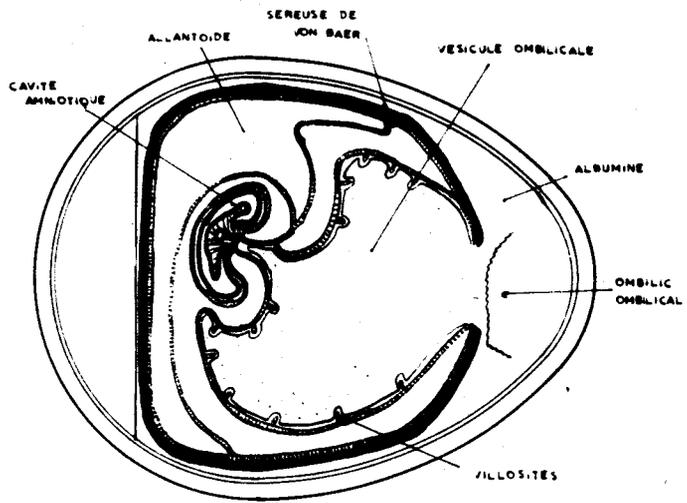
La membrane chorio-allantoïdienne est primitivement l'organe respiratoire de l'embryon . Elle est largement pourvue de vaisseaux sanguins et il existe un réseau capillaire important en relation avec la couche ectodermique externe . La membrane chorio-allantoïdienne est formée par la fusion de l'allantoïde et du chorion qui commence au 5e jour d'incubation : elle comprend trois couches, ainsi que nous pouvons l'observer Planche 1, fig. 1 .

- l'une, interne est faite de cellules épithéliales ; elle se trouve limitée par la cavité allantoïque .

- l'autre, moyenne, comporte les vaisseaux sanguins .

- la troisième, externe, est en contact direct avec la membrane coquillère . Aux 10e et 11e jours d'incubation, le réseau sanguin est étroitement accolé à la membrane coquillère . Ce sont les jours les plus favorables pour réaliser une injection intraveineuse .

Deux artères principales circulent du pédicule vitellin à la membrane chorio-allantoïdienne et le retour s'effectue par trois vaisseaux principaux : deux accompagnent les artères tandis que la veine allantoïque principale se situe séparément, elle est large et se meut librement .



ACH - artère amphiomésentériques  
 VOM - veine vombellomésentériques  
 AA - artère allantoïques  
 VA - veine allantoïques

Schéma des principaux vaisseaux sanguins chez l'embryon de poulet



C'est un point de repère pour désigner la position de l'embryon .

#### 4.1.2 - Principaux vaisseaux de la circulation sanguine

La circulation sanguine est composée essentiellement de trois arcs où le coeur joue le rôle de pompe ( fig. 1; 3 )

- l'arc vitellin : le sang est charrié vers le sac vitellin où il absorbe des éléments nutritifs; enrichi, il retourne au coeur qui le distribue à l'embryon lui-même .

- l'arc allantoïdien : il draine le sang de l'allantoïde . Comme la portion distale de l'allantoïde repose très près de la coquille de l'oeuf, le sang assure sa fonction respiratoire en éliminant le  $CO_2$  et en absorbant l' $O_2$  qui a traversé la coquille, et cela jusqu'à une époque avancée du développement .

- l'arc embryonnaire : la circulation intraembryonnaire comporte de nombreux vaisseaux distributeurs et collecteurs. Au niveau du coeur le sang des trois circulations est mélangé . Les artères omphalomésentériques et allantoïdiennes assurent respectivement la nutrition et l'oxygénation du sang . Les veines omphalomésentériques et allantoïdiennes apportent à l'embryon, par l'intermédiaire du coeur, les éléments de son alimentation

EXPERIMENTATION

## 1 - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DIFFUSION METASTATIQUE IN VIVO

Cette série expérimentale a été consacrée en majeure partie à la transplantation de cellules cancéreuses chez l'embryon de poulet selon la technique d'inoculation par voie intraveineuse que nous allons décrire . Ce travail a déjà fait l'objet de publications ( VLAEMINCK et al., 1970, 1971, 1972 ) .

Il nous a paru intéressant d'essayer d'inoculer conjointement des cellules néoplasiques par voie intracoelomique chez l'embryon de poulet en appliquant le processus expérimental classique de la greffe intracoelomique . Les résultats correspondant sont rapportés en fin de chapitre .

### 1.1 - Technique d'injection par voie intraveineuse

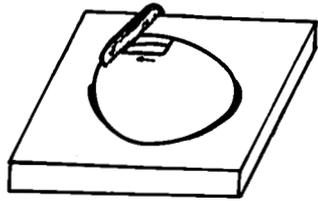
#### 1.1.1 - Matériel expérimental

##### 1.1.1.1 - Genre et espèce utilisé . Provenance des oeufs

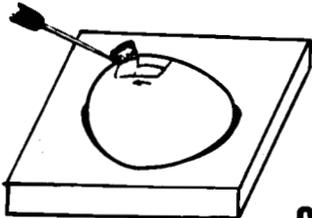
Les expériences sont réalisées sur des oeufs fécondés de poules ( Gallus domesticus ) de race Leghorns blanches, provenant d'un élevage des environs de Lyon .

##### 1.1.1.2 - Tumeur utilisée

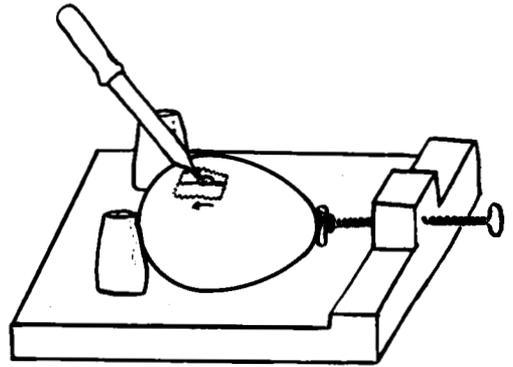
Il s'agit du carcinome d'Ehrlich ( Planche 1 ; 2 ) . Il a pour origine un épithélioma glandulaire de la mamelle de la souris, adapté à la greffe par EHRLICH ( 1906 ) . Cette tumeur suscite le développement d'une ascite dans laquelle pullulent, à l'état indépendant, les cellules tumorales . Celles-ci sont de taille variée, s'échelonnant entre 15 et 30 $\mu$  . Examinées sur frottis, elles comportent un noyau régulièrement arrondi, très chromophile, à chromatine dense, souvent nucléolé, autour duquel existe une mince bande protoplasmique parfois remplacée par un cytoplasme plus abondant, multivacuolaire . Le pouvoir prolifératif de cette tumeur est élevé ainsi qu'en témoigne le très grand nombre de figures mitotiques, parfois anarchiques, observées .



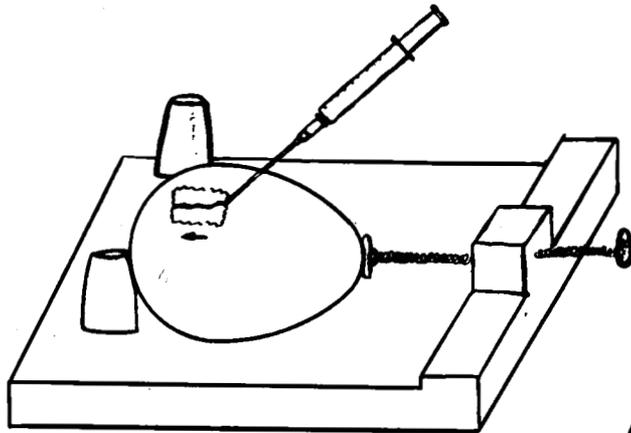
1



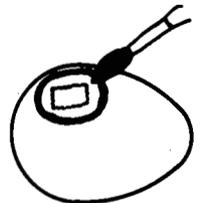
2



3



4



5



6



Dans notre expérimentation, après ponction intrapéritonéale de la souris porte-greffe, le liquide d'ascite est mélangé à du sérum physiologique, maintenu à la température de l'oeuf à inoculer, de façon à obtenir une concentration connue et reproductible de cellules tumorales, soit 10 000 cellules par ml dans un inoculat moyen de 0,05 ml .

### 1.1.1.3 - Appareillage

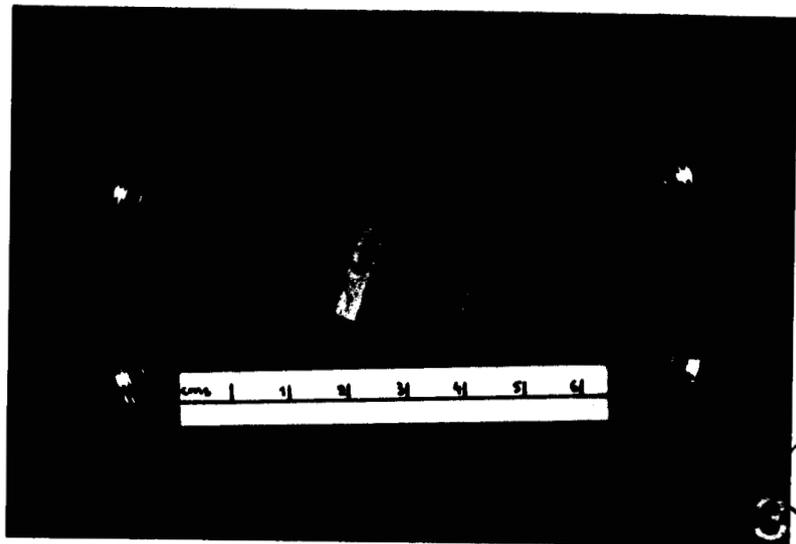
Les oeufs sont placés dans un incubateur à une température comprise entre 36,9°C et 37,5°C ; ils sont retournés trois fois par jour jusqu'au moment de leur inoculation .

Etant donnée la différence de taille qui existe d'un oeuf à l'autre, nous avons confectionné un dispositif réglable à ses dimensions afin de le maintenir immobile durant l'opération d'inoculation.

Nous avons jugé utile de modifier la technique d'injection couramment suivie depuis que EICHORN ( 1940 ) l'a décrite . Pour cela nous avons confectionné des micropipettes en verre étiré, infiniment plus acérées et moins traumatisantes que l'aiguille traditionnelle . Cette micropipette est reliée par un caoutchouc à une seringue refoulante de De Fonbrune permettant d'effectuer une injection lente, ce qui élimine tout risque de traumatisme au cours de la manipulation .

### 1.1.2 - Méthode d'inoculation

C'est au 11e jour de l'incubation que les embryons reconnus viables par mirage sont préparés pour l'expérimentation . On localise une veine de la membrane chorio-allantoïdienne ainsi que la direction du flux sanguin . Les 10e et 11e jours de l'incubation sont les dates les plus favorables pour réaliser une injection intraveineuse . En effet, le réseau sanguin de la couche moyenne de la chorio-allantoïde se trouve alors étroitement accolé à la membrane coquillière, donc très en surface .



De façon stérile et à l'aide d'une loupe binoculaire, le vaisseau choisi est mis en évidence par la technique usuelle ( EICHORN, 1940 ), c'est à dire par élimination de la coquille sus-jacente et dépôt d'une goutte d'huile minérale sur la membrane coquillière ( fig. 2 ; 1,2,3 ). Comme cette dernière adhère étroitement à la membrane chorio-allantoïdienne, le vaisseau est ainsi très bien individualisé .

L'oeuf étant maintenu parfaitement immobile sur le portoir réglé à ses dimensions, une injection lente ( 30 secondes environ ) et non traumatisante est effectuée à l'aide de la seringue de De Fonbrune munie d'une micropipette en verre étiré . Lorsque l'injection est terminée, l'aiguille de verre est retirée très doucement et la coquille est refermée par lutage à la paraffine ( fig. 2 ; 4,5 et 6 ) . Les oeufs sont remis en incubation à 37°C .

### 1.1.3 - Examen microscopique des organes

#### 1.1.3.1 - Observation en microscopie photonique

Les organes embryonnaires et le sac vitellin sont placés dans une solution de formol à 10% durant au moins 24 heures . Puis, ils sont traités par les techniques histologiques classiques et coupés à 4 $\mu$  . Les colorants employés sont l'hémalum-éosine, hémalum-érythrosine-safran, P.A.S-hémalum . L'intérêt de cette dernière est qu'elle met en évidence les membranes basales, notamment celles des vaisseaux .

En ce qui concerne la membrane chorioallantoïdienne, les prélèvements ont été faits selon la méthode de LEIGHTON ( 1963 ) , ( fig. 3 ; 1,2,3 ) . Les sections histologiques que nous avons obtenues, recouvrent une grande partie de cet organe extraembryonnaire et offrent sur une seule coupe une surface d'observation considérable, propice à l'étude des rapports entre les cellules cancéreuses et le système vasculaire abondant de la membrane .

### 1.1.3.2 - Observation en microscopie électronique

On effectue une double fixation glutaraldéhyde 1,5% - acide osmique 2%. Les inclusions sont faites dans l'épon selon la technique de LUFT ( 1961 ), afin de réaliser des coupes semi-fines et des ultra-coupes imprégnées d'acétate d'uranyle et d'oxyde plomb (REYNOLDS, 1963) . Les examens ont été réalisés à l'Elmiskop Siemens IA sous 80 kW de tension, avec grossissements directs de 1 000 à 40 000 .

## 1.2 - Constatations expérimentales

### 1.2.1 - Evolution générale des embryons après inoculation

Plus de 500 oeufs embryonnés ont été ainsi inoculés . Mais nous n'avons retenu dans cette analyse que les 245 derniers, c'est à dire ceux qui ont été inoculés à partir du moment où l'injection a été jugée satisfaisante sur le plan technique et suivie d'un bon rendement . Au fur et à mesure de la mise au point de la technique, le taux moyen de survie s'est élevé de 20 à 80% . Deux éléments ont permis d'améliorer ce rendement : d'une part, le maintien de l'inoculat à une température constante, voisine de celle de l'embryon durant les manipulations ; d'autre part, le remplacement de l'aiguille par une micropipette reliée à une pompe .

L'évolution des embryons inoculés au 11e jour d'incubation et dont la mort n'est pas immédiate ou précoce se traduit, ou bien par une survie allant jusqu'à l'éclosion, ou bien par un décès à des quantités variables d'incubation à partir du 17e jour, ce qu'un mirage quotidien permet de déceler .

### 1.2.2 - Aspects macroscopiques

Les modifications de l'aspect macroscopique des viscères ne sont pas constantes . Par ailleurs, leur absence n'implique nullement qu'il n'y ait pas de métastases, celles-ci pouvant être seulement décelables à l'examen microscopique .

D'une manière générale, l'aspect le plus caractéristique est représenté par l'existence d'une augmentation globale du volume de l'organe, en particulier du foie, qui peut être énorme, et des reins dont le volume est susceptible de doubler ( Planche 1 ; 3 ) . De plus, la surface de ces viscères est parsemée de petits nodules blancs grisâtres, parfois simplement reconnaissables à la loupe, parfois tellement nombreux, comme au niveau du foie et des reins, que la surface de ces organes est granuleuse . Les phénomènes hémorragiques sont très fréquents, se traduisant par la présence de taches violacées irrégulières . On a remarqué qu'au niveau du cerveau, les nodules tumoraux sont souvent peu nombreux mais énormes, atteignant une taille égale à celle de l'ensemble du tissu cérébral qui est alors refoulé et comprimé . En revanche, au niveau du coeur et des poumons, les lésions macroscopiques sont le plus souvent discrètes, réduites à quelques minuscules nodules blanchâtres . Aucun nodule n'a jamais été observé à la surface de la rate de nos embryons ni au niveau du sac vitellin .

### 1.2.3 - Aspects microscopiques des métastases viscérales

Une étude systématique a été effectuée au niveau des organes suivants : foie, néphros, cerveau, coeur, poumon, rate . Elle concerne 176 embryons inoculés au 11e jour d'incubation, examinés entre le 17e et le 21e jour, soit à la suite du décès spontané pour 64 d'entre eux, soit à la suite d'un sacrifice pour les 112 autres ( Tableau I ) .

Les foyers métastatiques microscopiques sont très aisés à identifier au niveau des viscères, d'une part en raison des caractéristiques cytologiques propres aux cellules d'Ehrlich, d'autre part parce qu'ils réalisent des nodules tissulaires anormaux qui viennent prendre la place des structures normales . Quelques particularités méritent d'être notées en fonction du viscère considéré .

- Dans le foie, qui est le viscère le plus fréquemment envahi, l'importance de la diffusion métastatique est telle que peu de parenchyme normal reste reconnaissable .

Tableau I

REPARTITION DES METASTASES CHEZ DES EMBRYONS DE POULET AYANT  
 REÇU UN INOCULAT DE CELLULES TUMORALES D'EHRlich AU 11<sup>e</sup> JOUR  
 DE L'INCUBATION

<i>Date de l'incubation</i>	<i>Nombre d'animaux décédés</i>	<i>Métastases</i>	<i>Pas de métastases</i>
17	8	6	2
18	11	8	3
19	15	14	1
20	22	20	2
21	8	3	5
<i>Total</i>	64	51	13
<i>Date de l'incubation</i>	<i>Nombre d'animaux sacrifiés</i>	<i>Métastases</i>	<i>Pas de métastases</i>
17	1	1	0
18	30	13	17
19	24	14	10
20	52	34	18
21	5	3	2
<i>Total</i>	112	65	47



Encore qu'il soit alors souvent stéatosique et remanié par les hémorragies ( Planche 2 ; 3 ) .

- Les métastases cérébrales apparaissent souvent centrées par une petite flaque hémorragique qui représente certainement le reste vasculaire de ce qui a été la voie d'accès des cellules tumorales qui ont présidé à l'élaboration de la métastase en cause .  
( Planche 3 ; 2,3 ) .

- Les métastases pulmonaires nous sont toujours apparues de très petite taille, véritablement microscopiques, ce qui est assez singulier pour cet organe . Elles prédominent dans les zones corticales et siègent dans le tissu interstitiel ( Planche 2 ; 1 ) .

- Au niveau du métanéphros, compte tenu de l'âge d'incubation auquel la majorité des animaux sont examinés, les métastases se caractérisent par leurs contours imprécis avec infiltration irrégulière des cellules tumorales les plus périphériques, entre les structures tubulaires ( Planche 2 ; 2 ) .

- Les très rares métastases spléniques observées correspondent soit à des petits nodules bien circonscrits, soit à un envahissement quasi total de l'organe . L'augmentation de volume de la rate, en dehors de l'existence de toute métastase, est attribuée à une hyperplasie réticulaire diffuse .

- Dans le myocarde, les foyers métastatiques sont surtout de type infiltrant ( Planche 3 ; 1 ) .

- Enfin, nous avons observé des métastases vitellines, toujours microscopiques, centrées par une formation vasculaire et comme bridées par les mailles du réseau conjonctivo vasculaire de l'organe .

#### 1.2.4 - Répartition des foyers tumoraux dans les viscères

Afin de compléter la description des lésions observées, nous avons réalisé une étude quantitative de la répartition des foyers tumoraux dans les viscères embryonnaires et extra-embryonnaires .

Tableau II

INTENSITE DE LA DIFFUSION METASTATIQUE CHEZ L'EMBRYON DE POULET,  
ILLUSTREE PAR LES COTATIONS ATTRIBUEES AUX COUPES MICROSCOPIQUES  
DES DIFFERENTS ORGANES ET PAR LE RAPPORT ENTRE LA SOMME DE CES  
COTATIONS ET L'ENSEMBLE DE CELLES ATTRIBUEES A TOUS LES ORGANES  
EXAMINES

Cotation	Organes embryonnaires						Organes extra-embryonnaires	
	Foie	Reins	Rate	Poumons	Coeur	Cerveau	M.C.A.	Sac vitellin
Cotation attribuée à l'organe	312	144	17	103	166	189	203	85
Pourcentage	25%	12%	1,3%	8,4%	13,6%	15,5%	16,6%	7%



Il nous est vite apparu en effet que la densité des foyers tumoraux métastatiques variait non seulement d'un animal à l'autre, mais surtout d'un organe à l'autre .

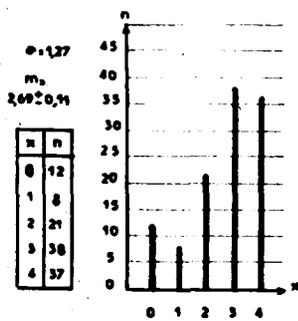
Nous avons exprimé cette prédilection ou cette non-prédilection organique en affectant chacun des organes considérés d'une cotation traduisant l'importance de l'infiltration tumorale, de façon à pouvoir quantifier les observations recueillies et, par là même, l'intensité de la diffusion métastatique au niveau de ces organes . Pour cela, nous avons déterminé une échelle de cotation de cette intensité, répartissant en cinq stades les aspects d'envahissement tumoral observé sur les coupes histologiques sériées . Toutes ces dernières examinées pour chaque organe, ont fait l'objet de cette cotation, constituant un reflet assez exact de l'intensité de la diffusion métastatique ; ce que nous avons représenté par un diagramme de fréquence des stades métastatiques ( fig. 6 ) . En fonction de cette cotation, la répartition de la diffusion métastatique dans les différents viscères est exprimée sous forme de pourcentage dans un tableau comparatif ( Tableau II ) . Il s'agit du rapport entre la somme des cotations attribuées aux coupes microscopiques d'un organe donné et la totalité des cotations attribuées à tous les organes examinés .

Il apparaît clairement que le foie est le lieu de prédilection des métastases expérimentalement induites, alors que la rate n'est pratiquement jamais atteinte .

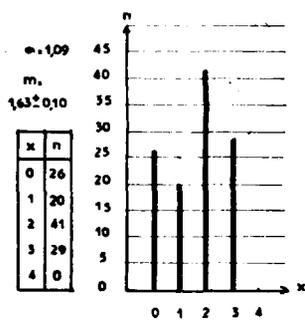
### 1.3 - Etude en microscopie photonique des métastases dans la membrane chorio-allantoïdienne

En raison de la fréquence des métastases dans la membrane chorio-allantoïdienne ( M.C.A. ) et la nature du tissu qui la constitue essentiellement, c'est à dire un mésenchyme lâche, richement vascularisé, nous avons pu y préciser la cinétique évolutive des cellules tumorales injectées .

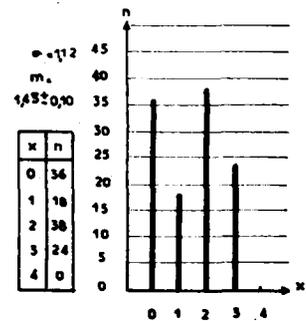
# DIAGRAMMES DE FREQUENCE DES STADES METASTATIQUES



FOIE

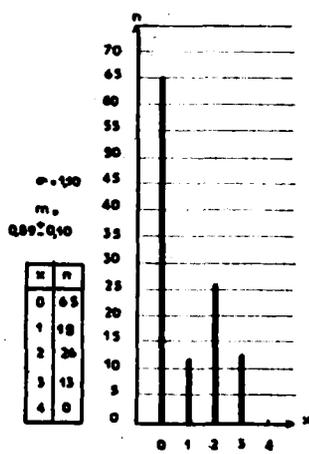


CERVEAU

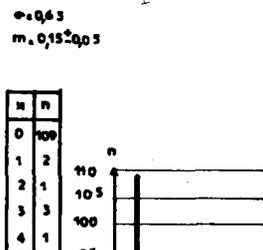


COEUR

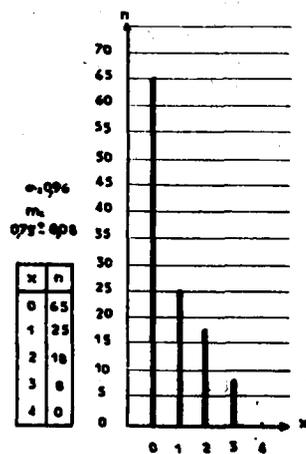
x : Stade métastatique  
n : Fréquence  
 $\sigma$  : Ecart type  
m : Moyenne  $\pm$  intervalle de confiance



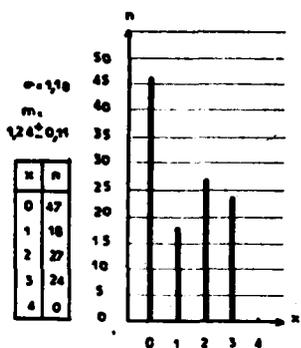
POUMONS



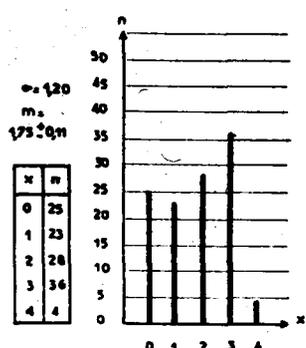
RATE



SAC  
VITELLIN



REINS



M.C.A.



Lorsque les foyers tumoraux sont très petits, ils sont toujours localisés au niveau du revêtement épithélial bistratifié accolé à la membrane coquillière où ils produisent une réaction proliférative qui multiplie les couches cellulaires épithéliales . Cette localisation élective des métastases à leur début conduit à penser qu'elles sont le résultat d'une embolisation des cellules tumorales d'Ehrlich dans les fines ramifications capillaires du revêtement épithélial . Ces ramifications ne sont que des prolongements des capillaires plus volumineux qui cheminent dans le tissu mésenchymateux sous-jacent ( Planche 4 ; 1,2 ) .

Au fur et à mesure de leur croissance, ces foyers envahissent progressivement le mésenchyme et finissent par en occuper toute l'épaisseur avant de s'étendre latéralement et de se rejoindre les uns les autres, si bien que la membrane chorioallantoïdienne est véritablement infestée en totalité par les cellules tumorales d'Ehrlich ( Planche 4 ; 3 ) .

Le mésenchyme de la membrane chorio-allantoïdienne s'est révélé un lieu assez privilégié pour observer la dissémination des cellules tumorales . A la périphérie des nodules décrits précédemment, on observe souvent une ségrégation monocellulaire des cellules tumorales. Les cellules d'Ehrlich isolées témoignent ainsi nettement de leur capacité de mobilisation active, après avoir été aptes à se détacher de leurs congénères . Très fréquemment, elles entrent en contact avec des capillaires et ce, de façon tellement élective, que l'on ne peut manquer d'évoquer l'existence d'un véritable tropisme qui entraîne les cellules vers les vaisseaux ( Planche 4 ; 4 ) . Lorsqu'elles sont assez nombreuses, les cellules tumorales accolées à un vaisseau s'ordonnent autour de lui en une disposition périthéliale et ont tendance, dans cette situation, à modifier leur morphologie ( Planche 5 ; 1 ) : de globuleuses, elles deviennent allongées, véritablement moulées sur la face externe du vaisseau ( Planche 5 ; 2 ) Ces aspects correspondent sans aucun doute à un stade prémonitoire d'une nouvelle dissémination vasculaire qui s'effectuera cette fois de dehors en dedans ( Planche 5 ; 3 ) .

Bien que nous n'ayons pas eu la chance d'observer de façon certaine le moment du franchissement de la paroi vasculaire, il est possible de voir le stade suivant sous forme de cellules tumorales accolées à la face interne d'un vaisseau, prenant alors la forme aplatie ou allongée des cellules endothéliales ( Planche 5 ; 4 ) .

#### 1.4 - Aspects ultrastructuraux au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne

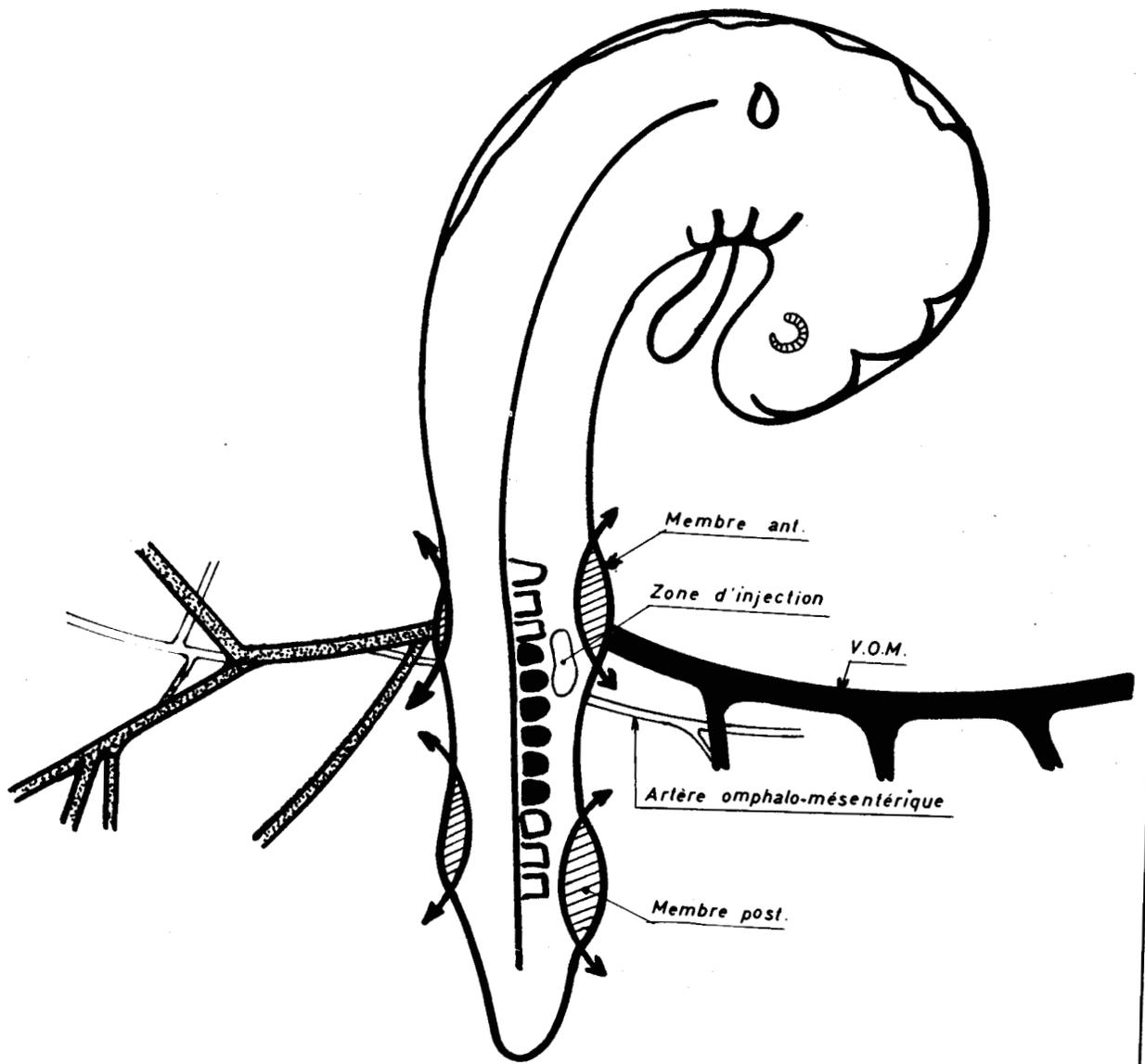
L'observation au microscope photonique ne fournit pas un pouvoir de résolution suffisant pour explorer le stade intermédiaire entre les deux précédents, à savoir le franchissement de la paroi vasculaire . Cet aspect de notre étude a fait l'objet de la Thèse de Doctorat en Médecine de Monsieur Y. MOUTON ( MOUTON et al., 1970 ) dont la collaboration nous a permis de corroborer les observations déjà effectuées en microscopie optique . Les nodules tumoraux examinés à ce niveau sont constitués de cellules d'Ehrlich groupées, sans intervalle, les unes contre les autres, les éléments normaux ayant disparu sauf les capillaires qui présentent des modifications morphologiques .

##### 1.4.1 - Rapports entre les cellules tumorales et les membranes basales non vasculaires

Ces phénomènes s'apparentent au premier temps de l'invasion tumorale dans un épithélioma, lorsque les cellules cancérisés se ségrégent dans le derme ou le chorion de la muqueuse .

Dans les nodules tumoraux invasifs, la couche mésenchymateuse et la couche chorionique, bien que totalement envahies de cellules d'Ehrlich, peuvent rester séparées par une membrane basale normale.

La ségrégation cellulaire d'une couche à l'autre se traduit par des modifications de la basale sous-chorionique . Une densification de la membrane basale sous-chorionique précède sa dissolution : la basale apparaît alors franchement interrompue . Dans ce cas, la cellule d'Ehrlich émet un prolongement cytoplasmique qui repousse la cellule chorionique ( Planche 6 ; 1 ) .



BUS  
L1111

#### 1.4.2 - Rapports entre les cellules tumorales et les capillaires

A la périphérie des nodules tumoraux, il est fréquent de voir des cellules d'Ehrlich en faible nombre, venir s'accoler sur la face externe d'un capillaire dont le diamètre et la lumière ne sont pas alors modifiés .

La paroi des capillaires subit d'importantes et intéressantes altérations se situant essentiellement au niveau de la membrane basale . Celle-ci devient hétérogène, floconneuse et s'effrite, prenant un aspect en " cendres de cigarettes " ( Planche 6 ; 1 ). Il peut y avoir une dissolution partielle ou totale de la membrane basale, la cellule tumorale venant ainsi au contact de la face externe de l'endothélium . Les réactions de la membrane basale apparaissent après les réactions de l'endothélium . Les membranes cellulaires de l'endothélium et de la cellule cancéreuse disparaissent pour être remplacés par une zone floue où cytoplasme endoplasmique et cytoplasme tumoral sont devenus indissociables, entourés de fragments de basale effritée ( Planche 6 ; 3 ) .

#### 1.5 - Inoculation par voie intracoelomique de l'embryon de poulet de 3 jours d'incubation

Nous avons voulu par cette méthode, où l'injection est réalisée dans un secteur de l'organisme sans relation avec le système circulatoire, apprécier l'affinité des cellules d'Ehrlich pour les organes de l'embryon de poulet .

##### 1.5.1 - Méthode

Au 3e jour de l'incubation, les embryons reconnus viables par mirage sont retenus pour l'expérimentation . La coquille de l'oeuf est découpée au dessus de l'embryon, puis une fente est pratiquée dans l'amnios . La suspension tumorale de cellules d'Ehrlich est inoculée dans la cavité coelomique au niveau d'une zone que l'on délimite de la façon suivante :

entre les membres postérieurs et antérieurs, dans la région du flanc de l'embryon, sous les somites . On prendra soin de ne pas léser le système sanguin qui commence à apparaître ( fig. 4 ) . L'injection est réalisée avec le même matériel que celui qui sert à réaliser les injections intraveineuses . La coquille est en dernier lieu refermée et l'oeuf placé à 37°C .

#### 1.5.2 - Résultats

Nous avons laissé de côté les embryons décédés spontanément après l'injection car l'autolyse gêne l'identification des cellules d'Harlich qui semblent par ailleurs absentes dans la majorité des cas .

Nous avons séparé en deux lots les embryons que nous avons sacrifiés, soit entre le 5e et le 7e jour de l'incubation, soit au 14e jour de l'incubation .

##### 1.5.2.1 - Inoculation au 3e jour - Sacrifice entre le 5e et le 7e jour

Sur les 12 embryons retenus, le coelome est envahi par de nombreuses cellules tumorales dans tous les cas, 5 animaux présentent des foyers tumoraux au niveau du foie et du myocarde .

##### 1.5.2.2 - Inoculation au 3e jour - Sacrifice au 14e jour

Parmi les 14 embryons considérés, 10 d'entre eux sont porteurs de foyers tumoraux dans un ou plusieurs organes . Les organes les touchés sont les poumons, le foie et le myocarde .

## 1.6 - Interprétation des résultats

### Fréquence métastatique

Si l'on considère l'ensemble des animaux décédés après le 17<sup>e</sup> jour suivant le début de l'incubation, ce qui représente 176 embryons, on constate que le pourcentage des prises tumorales n'est pas de 100 p. 100. Les foyers métastatiques sont présents dans 80 p. 100 des cas en ce qui concerne le lot des embryons décédés spontanément et dans 60 p. 100 des cas pour ce qui est de ceux que nous avons sacrifiés. Compte tenu des conditions expérimentales, on pouvait à priori s'attendre à une fréquence métastatique plus grande, or nous retrouvons ici, malgré l'état d'indifférence immunitaire de l'embryon de poulet, une constatation que nous avons antérieurement faite (ADENIS., 1962 ; DRIESSENS et al., 1963).

Nous avons en effet mis en évidence que la dissémination de cellules cancéreuses même en grande quantité, dans le torrent circulatoire, n'entraîne pas ipso facto l'apparition de métastases ganglionnaires ou viscérales. Les cellules cancéreuses injectées, dont le pouvoir de multiplication, d'infiltration et de greffe est cependant certain puisqu'il est vérifié expérimentalement, ne développent cette activité que dans certaines conditions encore mal précisées, mais que l'on peut estimer être sous la dépendance de l'organisme. Cette résistance est parfaitement concrétisée par l'existence d'amas quiescents de cellules tumorales " dormantes ", situées dans les lumières vasculaires ou dans l'intimité des tissus et qui demeurent dans cet état pendant longtemps.

Ces faits soulignent l'importance du " terrain " dans les phénomènes de diffusion métastatique des tumeurs malignes. Par certains mécanismes, l'hôte est capable de détruire des cellules tumorales en circulation, ou tout au moins de s'opposer à leur implantation, nécessaire pour qu'apparaisse une métastase. Les connaissances actuelles conduisent à penser que ces mécanismes sont certainement de nature immunologique.

### Répartition viscérale des foyers tumoraux

Si la distribution topographique et le pourcentage des métastases nous permettent de conclure à l'existence d'un envahissement généralement polyviscéral, ils n'accusent pas une identité de diffusion métastatique quel que soit l'organe envisagé . Surtout il apparaît évident qu'il y a une sélectivité d'envahissement des organes par les cellules tumorales . Le diagramme de fréquence des stades métastatiques ( fig. 6 ) et le calcul des pourcentages ( Tableau II ) pour chaque type d'organe examiné et comparativement étudiés, nous confirment les observations microscopiques effectuées .

Le foie est en effet de très loin l'organe le plus intensément touché par la diffusion métastatique puisqu'il héberge à lui seul 25% des métastases .

A l'inverse, la rate, malgré l'importance bien connue de la vascularisation, n'est pratiquement jamais sollicitée, puisqu'elle ne renferme que 1,3% des métastases .

Entre ces deux extrêmes, on trouve sensiblement sur le même rang, le cerveau ( 15,5% ), le coeur ( 13,6% ) et le néphros ( 12% ) tandis que les poumons ( 8,4% ) sont curieusement en avant dernière position juste avant la rate dont on vient de parler .

En ce qui concerne les poumons, le relativement faible pourcentage de cas dans lesquels nous avons observé des foyers tumoraux, ainsi que la taille toujours minime de ceux-ci, nous sont apparus de prime abord assez paradoxaux en regard de la fréquence habituelle des métastases pulmonaires chez l'homme et les autres mammifères ainsi que du lieu où est effectuée l'inoculation tumorale . Peut-être cela est-il dû au fait que la circulation pulmonaire est très réduite chez l'embryon de poulet dont les poumons n'ont, par définition, joué encore aucun rôle fonctionnel .

Pour ce qui est de l'encéphale, on doit rappeler à titre explicatif que c'est un lieu classiquement favorable au développement des tumeurs greffées . Le cerveau est alors considéré en grande partie à l'abri des mécanismes immunitaires et peut-être est-ce à ce titre que nous devons l'intensité de la diffusion métastatique à son niveau .

Nous avons observé d'assez nombreux petits foyers métastatiques dans le sac vitellin, en général bien ordonnés autour de vaisseaux dont la lumière contenait également des cellules cancéreuses en margination . Cela mérite d'être souligné car, si certains ont réussi à cultiver des cellules tumorales dans le sac vitellin (TAYLOR et CARMICHAEL, 1949 ; LEVI MONTALCINI et HAMBURGER, 1951 ; BUEKER, 1948 ), d'autres considèrent cet organe comme impropre à la survie des cellules cancéreuses ( EASTY et al., 1969 ) .

Nous avons inoculé des cellules tumorales d'Ehrlich chez l'embryon de poulet, à un stade très précoce, au 3e jour de l'incubation, dans la cavité coelomique qui est sans relation avec le système circulatoire, afin de suivre leur migration dans divers organes et de la comparer avec nos résultats précédents .

Les premières observations que nous avons effectuées, révèlent que les cellules ainsi diffusées par migration active se concentrent essentiellement dans le foie, le myocarde et les poumons.

En ce qui concerne le foie, on peut se demander si l'on ne retrouve pas là, la toute particulière affinité des cellules d'Ehrlich pour les hépatocytes de l'embryon de poulet . Cette migration préférentielle est un argument de plus en faveur de l'importance du terrain local dans la diffusion métastatique d'une tumeur donnée chez un hôte donné .

Le résultat est plus surprenant en ce qui concerne les poumons et il est opposé à celui que nous avons obtenu par la technique d'injection par voie intraveineuse .

Ces faits peuvent mettre en cause la " date " de l'inoculation mais aussi une vulnérabilité plus importante du tissu embryonnaire dans les premières étapes de sa formation .

#### Etude particulière de la membrane chorio-allantoïdienne

En raison de sa situation privilégiée vis-à-vis du lieu d'injection des cellules tumorales, il apparaît bien normal que la membrane chorio-allantoïdienne soit fréquemment le siège de très nombreux nodules tumoraux . La diffusion tumorale à ce niveau, déjà étudiée par LEIGHTON ( 1967 ) à l'aide de diverses ascites tumorales du rat, fournit d'intéressantes constatations dans la mesure où la structure mésenchymateuse richement vascularisée de la membrane chorio-allantoïdienne permet d'analyser certains aspects du phénomène de l'invasion tumorale, en particulier celui des rapports réciproques des cellules cancéreuses et des vaisseaux . C'est le mérite de l'ultrastructure d'apporter quelques précisions morphologiques à ce sujet . En effet, les modifications de l'aspect des membranes basales, au moment où les cellules tumorales commencent à venir à leur contact, rappellent en partie les observations déjà faites dans le processus inflammatoire en ce qui concerne la leucodiapédèse ( MARCHESI et GOWANS, 1964 ; FLOREY et GRANT, 1961 ) . Les aspects observés permettent de suspecter l'action d'un facteur biochimique lytique qui, par analogie avec les lysosomes leucocytaires, pourrait être de nature enzymatique .

## 2 - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DIFFUSION METASTATIQUE IN VITRO

Nous avons, dans une première série expérimentale, montré que l'inoculation par voie intraveineuse de cellules tumorales ascitiques d'Ehrlich chez l'embryon de poulet, se traduit par un envahissement tumoral, en général polyviscéral mais inconstant malgré l'état d'indifférence immunologique des embryons. Le foie, dans notre système expérimental, apparaît particulièrement favorable au développement des foyers métastatiques, tandis que la rate n'est pratiquement jamais atteinte.

Sur la base de ces constatations et afin d'apprécier les raisons des différences observées, nous avons étudié le comportement de la tumeur d'Ehrlich vis-à-vis de ces organes embryonnaires ( foie, rate, néphros, poumons, bourse de Fabricius ), isolés de l'organisme, en culture organotypique affrontée, afin de bien préciser le rôle éventuel du terrain local dans les affinités constatées.

Enfin, nous avons interposé un filtre millipore entre le tissu tumoral et le tissu embryonnaire afin d'apprécier si le contact cellulaire entre ces deux tissus était nécessaire au facteur déterminant la migration des cellules cancéreuses.

### 2.1 - Technique de culture organotypique

#### 2.1.1 - Origine des explants

##### 2.1.1.1 - Organes embryonnaires

Les organes embryonnaires sont prélevés sur des embryons de poulet Leghorn blanc âgés de 11 jours d'incubation, excepté la bourse de Fabricius dont le prélèvement se fait dans la troisième partie du temps d'incubation.

### 2.1.1.2 - La tumeur

La tumeur solide utilisée est obtenue en 7 à 10 jours par greffe sous cutanée d'ascite d'Ehrlich dans la région dorsale de la souris Swiss . Autant que possible, on choisit une tumeur assez petite, pour éviter la nécrose toujours possible et préjudiciable à la réussite de la culture . Dans ces conditions, la tumeur est ferme et vivace .

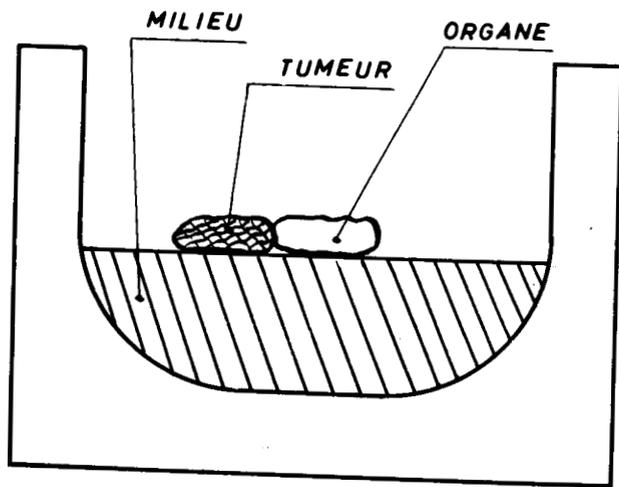
### 2.1.2 - Technique de culture

#### 2.1.2.1 - Préparation du milieu de culture

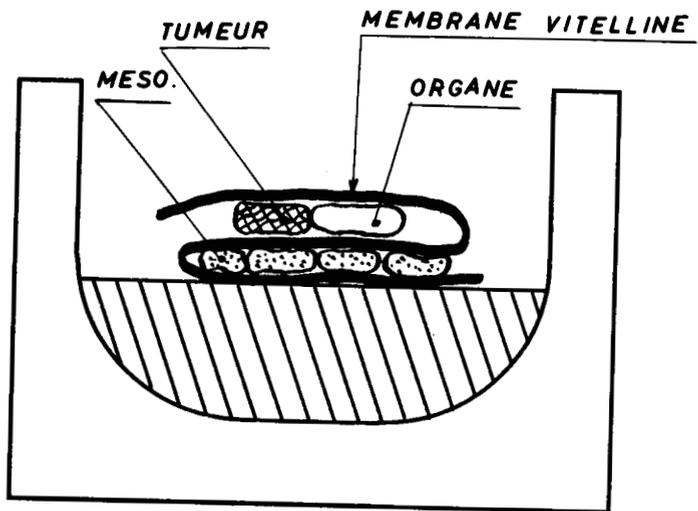
Les cultures se font dans des verres de culture ou salières ayant la forme d'un parallélépipède à section carrée, de 4 cm de côté et de 1,5 cm de hauteur . Ils sont évidés dans la partie supérieure en calotte sphérique . La salière est fermée par une lame de verre lutée à la paraffine ( fig. 5 ) . Dans cette cupule de cultures, nous mettons successivement et dans les proportions suivantes :

- Le liquide de Tyrode ... 5 gouttes
- Le sérum de cheval ( Gibco) .... 4 gouttes
- L'extrait d'embryons de poulet ( Difco ) ... 3 gouttes  
dilué à 60% dans le liquide de Tyrode
- La pénicilline ( 100 Unités ) ... 1 goutte
- La gélose, contenant 1g d'agar pour 100ml  
de liquide de Gey et maintenue à 50°C ... 9 gouttes

Tous ces composants sont intimement mêlés à l'aide d'une fine baguette de verre afin de réaliser un milieu homogène .



I



II



La composition de notre milieu de culture est légèrement différente par les proportions de ses constituants de celui qu'emploient WOLFF et al , . Nous n'avons jamais modifié la composition de notre milieu de culture au cours de nos expériences .

#### 2.1.2.2 - Technique d'explantation

La technique que nous avons employée, est celle qui a été mise au point par WOLFF et al., ( 1952 ) . Le principe en est le suivant:

Les fragments viscéraux de  $2\text{mm}^3$  environ provenant des embryons de poulet, sont placés au contact de fragments de tumeur d'Erlich de même taille ( fig. 5 ) . Le dépôt des explants se fait sous la loupe binoculaire de même que leur asséchement à l'aide d'un fin papier buvard . La culture est enfermée dans la salière par une lame de verre, lutée à la paraffine . Les salières sont placées à l'obscurité dans une étuve maintenue à  $37^{\circ}\text{C}$  .

Les besoins nutritifs de certains explants peuvent nécessiter un " repiquage " , c'est à dire un renouvellement du milieu de culture le 3e jour suivant l'explantation . Parfois, il est nécessaire d'assécher le milieu une nouvelle fois, le lendemain ou le surlendemain suivant la mise en culture .

#### 2.1.3 - Examen microscopique des organes

Les fragments accolés se soudent en 48 h au maximum . Une semaine après l'explantation, l'ensemble de la culture est fixé au formol et traité selon les techniques histologiques classiques .

#### 2.1.4 - Méthode statistique

Si l'on désigne par

n le nombre total de nos expériences, c'est à dire le nombre d'associations embryonnaires et tumorales soumises à l'examen microscopique .

r le nombre de résultats observés, c'est à dire le nombre de ces associations où l'organe embryonnaire est envahi par la tumeur .

Le pourcentage d'infiltration tumorale de l'organe embryonnaire q sera égal à :

$$q \% = \frac{r}{n} \times 100$$

Le nombre de nos expériences par catégorie étant toujours ou pratiquement toujours inférieur à 100, nous avons fait suivre le pourcentage d'infiltration tumorale de deux nombres représentant les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de confiance avec un coefficient de sécurité de 95 % . Ces limites sont déterminées par le calcul ( LAMOTTE, 1962 ) .

## 2.2 - Comportement de la tumeur d'Ehrlich associée a du foie et à de la rate embryonnaires de poulet

Avant de réaliser des associations d'organes embryonnaires et de tumeur d'Ehrlich, nous avons cultivé le fragment tumoral seul sur le milieu . Par la suite, au cours de nos expériences, il nous a paru intéressant de toujours comparer la survie des associations avec celle du fragment tumoral cultivé seul sur le milieu, ainsi qu'avec l'état de la tumeur au moment de l'explantation .

Nos résultats précédemment acquis, nous ont dicté notre plan de travail . C'est pourquoi en premier lieu, nous avons réalisé une étude comparée du comportement du foie et de la rate embryonnaires de poulet en association avec la tumeur d'Ehrlich .

### 2.2.1 - Culture de la tumeur d'Ehrlich

La culture isolée de fragments tumoraux s'est soldée par un échec constant . Au bout de 3 jours, au maximum, l'explant tumoral est totalement nécrosé et se dissocie .

Donc, lorsque le tissu tumoral est cultivé seul, il périclite ( Planche 7 ; 1,2 ) .

En revanche, la présence d'un organe embryonnaire de poulet peut permettre sa multiplication comme si les cellules cancéreuses se nourrissaient aux dépens de l'organe, qui lui, puise ses éléments nutritifs dans le milieu ( Planche 7 ; 3 et 4 ) . Afin de préciser le rôle du foie et de la rate embryonnaires de poulet dans l'invasion tumorale, nous avons comparé le comportement de la tumeur d'Ehrlich vis-à-vis de ces organes . Les explants, hépatique et splénique, sont placés séparément au contact de l'explant tumoral. Les fragments accolés se soudent en 48 heures . Huit jours après l'explantation, l'association tissulaire est fixée au formol à 10 % puis coupée en série à 4 $\mu$  et colorée à l'hémalum-éosine .

## 2.2.2 - Associations hépatique et tumorale

### 2.2.2.1 - Aspect histologique des explants

#### - Fragment hépatique

Le fragment hépatique présente pratiquement toujours une structure générale en cocarde . Le centre du fragment est en effet nécrosé, sans cellules identifiables . Autour on reconnaît, un peu estompée, la structure du foie telle qu'elle était au moment de l'explantation . Enfin en périphérie, c'est à dire dans la zone de contact avec le milieu de culture, se trouve le foyer de néogénèse hépatique témoignant de la réalité et de la qualité de la culture ( Planche 8 ; 1,2,3 ) .

#### - Fragment tumoral

Le fragment tumoral se présente un peu de la même manière bien qu'avec une structure d'ensemble beaucoup plus irrégulière ; les zones de prolifération et de nécrose étant intriquées .

Dans les zones non nécrotiques, la prolifération, à côté de la survie, est parfaite, ainsi qu'en témoignent de nombreuses figures mitotiques. Par exception, lorsque le fragment tumoral est très nécrotique, ce qui est rare, il existe au niveau de la zone d'affrontement, une bande de cellules demeurées vivaces, comme si le fragment de foie adjacent jouait le rôle d'un tissu nourricier. ( Planche 9 ; 1 )

#### - Infiltration tumorale du fragment hépatique

Ce qui est toutefois le plus frappant dans cette culture affrontée, c'est la fréquence avec laquelle on observe un envahissement, par des cellules tumorales, du fragment de foie situé à proximité de la zone d'affrontement. Les cellules cancéreuses non seulement survivent et se multiplient sur place, mais encore s'infiltrant dans le foie, indispensable à leur culture organotypique ( Planche 9 ; 3 ) . A côté de cet envahissement de proche en proche, avec parfois des images de pénétration des cavités vasculaires du foie, il est possible d'observer de véritables foyers métastatiques in vitro situés dans le fragment hépatique très loin de la zone d'affrontement ( Planche 9 ; 2,4 ) .

#### 2.2.2.2 - Résultats numériques

Sur les 65 associations retenues, de foie embryonnaire de poulet et de tumeur d'Ehrlich de la souris, nous avons constaté ( Tableau III ) :

- une bonne survie du fragment embryonnaire dans 85 % des cas .

- une bonne culture du fragment tumoral dans 85 % des cas .

- une infiltration tumorale du fragment embryonnaire dans 78 % des cas .

### 2.2.2.3 - Conclusions

Il nous est permis d'affirmer qu'il n'y a pas d'incompatibilité entre les deux tissus associés : fragment tumoral d'Ehrlich de la souris Swiss et fragment hépatique embryonnaire de poulet . Au contraire, le foie, dans notre système expérimental est très favorable à la culture de la tumeur d'Ehrlich, puisqu'il permet la survie et la multiplication des cellules cancéreuses .

D'ailleurs à quatre reprises, nous avons essayé de repiquer cette association tissulaire . Après 36 jours de culture, nous avons constaté que le tissu hépatique embryonnaire et le tissu cancéreux demeuraient en bon état avec persistance de signes de multiplication cellulaire et surtout un envahissement tumoral très actif .

Compte tenu des constatations désormais classiques de WOLFF sur l'effet bénéfique qu'apporte à la culture organotypique des tumeurs, la présence de fragments de mésonéphros, nous avons réalisé l'affrontement foie-mésonéphros-tumeur ( fig. 5 ; 2 ) . Une telle culture n'a pas entraîné d'amélioration de la qualité de la culture du fragment tumoral, ni d'augmentation de sa survie, ni une infiltration hépatique plus intense .

### 2.2.3 - Associations splénique et tumorale

#### 2.2.3.1 - Aspect histologique des explants

##### - Culture du fragment splénique

La culture du fragment splénique est de bonne qualité . Là encore, nous avons observé un aspect général en cocarde avec un centre nécrotique ( Planche 10 ; 1 ), une zone intermédiaire où l'on reconnaît parfaitement la structure de la rate embryonnaire et une zone périphérique correspondant à une prolifération mésenchymateuse de cellules allongées de type fibroblastique au milieu desquelles existent parfois des amas de grandes cellules multinucléées de nature histiocytaire probable ( Planche 10 ; 2 ) .

- Culture du fragment tumoral associé

En ce qui concerne le fragment tumoral, sa culture affrontée, s'est soldée par un échec complet dans plus de la moitié des cas : après 6 jours de culture, la tumeur n'était plus représentée que par un amas nécrotique . Parfois, le fragment tumoral survit en partie et même se développe, puisque l'on observe des mitoses ; mais il nous est apparu très singulier que dans ces cas favorables, la portion tumorale survivante était celle située le plus loin de la zone d'affrontement avec la rate, zone au niveau de laquelle la tumeur est constamment nécrotique ( Planche 10 ; 3 ) .

- Infiltration du fragment splénique par les cellules cancéreuses

Dans ces conditions, à fortiori, nous n'avons jamais observé de pénétration de la rate par les cellules cancéreuses, contrairement à ce qui avait été observé avec le fragment hépatique .

2.2.3.2 - Résultats numériques

Nous avons retenu un nombre total de cultures égal à 40 et nous avons remarqué au niveau de ces associations rate embryonnaire de poulet - tumeur d'Ehrlich de la souris :

- une bonne culture du fragment embryonnaire dans près de 90 % des cas .
- une bonne culture du fragment tumoral dans 40 % des cas seulement .
- l'infiltration tumorale du fragment embryonnaire est de 0 % .

Tableau III

COMPORTEMENT DE LA TUMEUR D'EHRlich ASSOCIEE IN VITRO A DU  
FOIE ET DE LA RATE EMBRYONNAIRE DE POULET

	Types d'associations réalisées in vitro	
	Foie embryonnaire de poulet et tumeur d'Ehrlich de souris	Rate embryonnaire de poulet et tumeur d'Ehrlich de souris
Nombre total de cultures	65	40
Bonne culture du fragment embryonnaire	55	35
Bonne culture de la tumeur	53	16
Infiltration tumorale du fragment embryonnaire	49	0
% d'infiltration tumorale	78% 63 à 85	0%



### 2.2.3.3 - Conclusion

Il semble y avoir une incompatibilité entre les deux tissus associés : fragment tumoral d'Ehrlich et fragment splénique embryonnaire de poulet . La rate est ainsi très peu favorable à la culture de la tumeur d'Ehrlich ( Tableau III ) .

### 2.3 - Comportement de la tumeur d'Ehrlich associée à d'autres viscères de l'embryon de poulet

Etant donnée la concordance de nos résultats obtenus in vivo et in vitro pour le foie et la rate, nous nous sommes proposés de vérifier s'il y avait également concordance entre les constatations concernant d'autres viscères comme le mésonéphros et les poumons . Les fragments de mésonéphros et de poumons sont prélevés chez des embryons de poulet de 9 à 11 jours d'incubation et sont cultivés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour le foie et la rate embryonnaires .

Nous avons voulu, par ailleurs, rechercher le degré d'infiltration tumorale au niveau d'un autre organe lymphoïde que la rate : nous avons retenu la bourse de Fabricius . Les fragments de cet organe sont prélevés entre le 18e jour de l'incubation et l'éclosion.

#### 2.3.1 - Associations de mésonéphros et de tumeur d'Ehrlich

##### 2.3.1.1 - Aspect histologique des explants

##### - Culture du fragment mésonéphrétique

Le fragment de mésonéphros présente toujours une structure identique à celle qu'il avait lors de l'explantation . Les tubules mésonéphrétiques sont bien conservés . Lorsqu'il y a nécrose, la quasi totalité de l'explant en est affectée .

##### - Culture du fragment tumoral associé

Au contact du mésonéphros, le fragment de tumeur se cultive assez bien .

Il n'existe pas de zones de nécrose tumorale au contact du fragment embryonnaire . Les figures mitotiques sont nombreuses .

- Infiltration tumorale du fragment mésonéphrétique

La tumeur se multiplie et envahit les tissus sains ( Planche 11 ; 1 ) . Elle s'infiltré tout d'abord dans le mésenchyme qui est un tissu assez lâche, puis peu à peu pénètre jusque dans les tubules du mésonéphros qui disparaissent . La ségrégation des cellules tumorales est importante mais l'invasion du mésonéphros par celles-ci n'est pas massive . Il s'agit plutôt de migrations isolées . En tout cas, on n'observe pas, comme dans le foie, de nodules cancéreux éloignés de la zone de contact entre les deux explants .

2.3.1.2 - Résultats numériques

Sur les 52 associations de mésonéphros embryonnaire de poulet et de tumeur d'Ehrlich de la souris, considérés, nous avons pu constater :

- une bonne survie du mésonéphros dans 85 % des cas .
- une bonne culture de la tumeur pour 64 % des échantillons .
- une infiltration tumorale du fragment embryonnaire dans 58 % des cas .

2.3.1.3 - Conclusions

Nous pouvons dire qu'il n'y a pas d'incompatibilité entre les cellules cancéreuses d'Ehrlich de la souris et le rein embryonnaire de poulet . Le mésonéphros est un organe favorable à la prolifération des cellules tumorales . La multiplication tumorale est accompagnée d'une migration des cellules cancéreuses dans l'organe embryonnaire, qui se propagent la plupart du temps par émissaires isolés ( Tableau IV ) .

Tableau IV

Comportement de la tumeur d'Ehrlich associée, *in vitro*, à du  
 mésonéphros et du poumon embryonnaires de poulet

	Types d'associations réalisées <i>in vitro</i>	
	Mésonéphros embryonnaire de poulet Tumeur d'Ehrlich de souris	Poumon embryonnaire de poulet Tumeur d'Ehrlich de souris
Nombre total de cultures	52	30
Bonne culture du fragment embryonnaire	44	20
Bonne culture de la tumeur	33	17
Infiltration tumorale du fragment embryonnaire	30	5
% d'infiltration tumorale	58% 54 à 72	17% 5 à 34



## 2.3.2 - Associations de poumon et de tumeur d'Ehrlich

### 2.3.2.1 - Aspect histologique des explants

#### - Fragment pulmonaire

Le fragment pulmonaire que nous explantons prolifère très activement dans un assez grand nombre de cas . L'aspect normal des tubes bronchiques est parfaitement reconnaissable .

#### - Fragment tumoral

Dans les cas favorables de la culture associée, la tumeur présente une bonne survie, ainsi qu'en témoignent les figures mitotiques et il n'y a aucune zone de nécrose tumorale au contact de l'explant embryonnaire .

#### - Infiltration tumorale du fragment pulmonaire

Néanmoins la zone de jonction des explants est dans la majorité des cas bien nette . Même lorsque les conditions semblent particulièrement propices à une invasion tumorale ( les explants embryonnaire et tumoral sont bien soudés, la survie de part et d'autre est parfaite ), nous n'observons d'infiltration que dans un nombre restreint de cas ( Planche 11 ; 2 ) . D'ailleurs, on n'assiste jamais à une invasion massive du poumon par les cellules tumorales, mais plutôt à l'infiltration de quelques cellules ségréguées marginales au tissu pulmonaire .

### 2.3.2.2 - Résultats numériques

Nous avons réalisé 30 associations de ce type ( Tableau IV ) .

- la survie du fragment pulmonaire a été bonne pour 20 d'entre elles, soit dans 67 % des cas .
- celle du fragment tumoral dans 56 % des cas .
- une légère infiltration tumorale du poumon a été observée dans 5 cas, soit 17 % .

### 2.3.2.3 - Conclusions

Les explants mis au contact l'un de l'autre, ne manifestent aucune incompatibilité . Mais l'infiltration tumorale au niveau du poumon embryonnaire de poulet est relativement faible .

### 2.3.3 - Associations de bourse de Fabricius et de tumeur d'Ehrlich

#### 2.3.3.1 - Rappel morphologique

La bourse de Fabricius est un organe épithélio-lymphoïde, spécifique aux oiseaux, que l'on peut rapprocher du thymus aussi bien en ce qui concerne sa structure que sa fonction . Son apparition sous forme de primordium débute au 5e jour de l'incubation, mais son organisation se poursuit jusqu'à l'éclosion . L'organe atteint sa taille maximale entre la 5e et la 12e semaine suivant la naissance du poussin . La mise en évidence fonctionnelle (GLICK et al., 1956 ) et histologique ( RUTH et al., 1964 ) de la bourse de Fabricius est relativement récente . Des expériences effectuées par GOOD et al., 1966, COOPER et al., 1966, ont permis d'établir le rôle de la bourse de Fabricius, en temps qu'organe central dans un système immunitaire bursal-dépendant, dans le contrôle de la production des immunoglobulines et la formation d'anticorps spécifiques .

#### 2.3.3.2 - Aspect histologique des explants

##### - Fragment embryonnaire

Les fragments de bourse de Fabricius sont prélevés entre le 18e jour de l'incubation et l'éclosion . Dans le cas présent, nous sommes obligés de mettre en culture des explants d'une taille plus importante qu'à l'ordinaire, afin de conserver une structure organisée .

Le fragment de bourse de Fabricius présente généralement en culture, deux zones, dont l'une centrale a tendance à se nécroser et l'autre périphérique est extrêmement vivace . La structure initiale n'est pas tellement modifiée . D'une manière générale, la bourse de Fabricius en culture organotypique in vitro survit bien . Nous avons pu améliorer cette survie, en renouvelant le milieu de culture 3 jours après l'explantation . Ce repiquage est nécessaire à la croissance de l'organe embryonnaire dont les besoins nutritifs sont certainement supérieurs à ceux des autres organes .

- Fragment tumoral

Dans la majorité des cas, le fragment tumoral est très nécrotique ( Planche 11 ; 3 ) . Lorsque la tumeur comprend encore des cellules vivaces, elles sont pratiquement toujours localisées à l'opposé de la zone de jonction de l'explant embryonnaire et de la tumeur .

- Infiltration tumorale du fragment de bourse de Fabricius

Le premier obstacle à la migration des cellules tumorales au niveau de la bourse de Fabricius, est la difficulté qu'ont les explants à se souder . En effet, les deux tissus associés ne se soudent pas dans la majorité des cas, par conséquent il est difficile dans ces conditions d'observer des migrations de cellules tumorales . Il n'en reste pas moins vrai que lorsque les explants sont soudés, une importante zone de nécrose tumorale se situe en regard du fragment embryonnaire . Ce n'est qu'à titre exceptionnel, là encore, que nous avons pu observer un très petit nombre de cellules tumorales franchir la zone de jonction et pénétrer le tissu sain .

L'analyse des coupes effectuées à partir d'associations repiquées a mis en évidence une amélioration de la survie de l'organe embryonnaire mais ne nous a pas fait remarquer une infiltration tumorale plus importante .

Les cellules tumorales au sein de la tumeur ont tendance à se ségréger, mais elles s'arrêtent devant la zone limitant les deux tissus, dans la quasi totalité des cas .

### 2.3.3.3 - Résultats numériques

Nous avons réparti en deux lots, nos associations tissulaires

- Lot non repiqué

- on note 80 % de bonne survie du fragment embryonnaire .
- 10 % de bonne culture du fragment tumoral .
- une infiltration tumorale nulle .

- Lot repiqué

- nous observons 90 % de bonne culture du fragment embryonnaire .
- 15 % de bonne survie du fragment tumoral .
- une infiltration tumorale nulle .

### 2.3.3.4 - Conclusions

Il existe une assez importante incompatibilité entre la bourse de Fabricius embryonnaire de poulet et la tumeur d'Ehrlich de la souris . Cet organe semble peu favorable à sa culture, les résultats observés étant sensiblement identiques à ceux obtenus avec la rate .

## 2.4 - Comportement de certaines associations séparées par un filtre millipore

L'injection par voie intraveineuse de cellules tumorales d'Ehrlich chez l'embryon de poulet, se traduit par l'apparition de métastases induites dans le foie . Le pourcentage de ces métastases est élevé . Au contraire dans la rate, leur pourcentage est relativement faible .

La culture organotypique de fragments embryonnaires de foie et de rate de poulet associés à de la tumeur d'Ehrlich montre un degré d'infiltration tumorale élevé pour le foie mais nul pour la rate .

Ces constatations nous ont amenées à soumettre notre système expérimental à certaines investigations, en particulier à interposer un filtre millipore entre le fragment de foie ou de rate et la tumeur, in vitro, pour voir si dans ces conditions ( absence de facteurs immunologiques, circulatoires, de contact cellulaire ) l'appel préférentiel des cellules d'Ehrlich existe encore .

#### 2.4.1 - Méthode

Les deux tissus, embryonnaire et tumoral, sont séparés par une paroi plus ou moins perméable, un filtre millipore dont la taille des pores ( 14 $\mu$  ) est à la limite inférieure de celle des cellules néoplasiques utilisées .

#### 2.4.2 - Résultats

##### 2.4.2.1 - Associations hépatique et tumorale séparées par un filtre millipore

Sur les 30 associations que nous avons réalisées, la moitié d'entre elles montre des explants dont la survie est moyenne . L'autre moitié, renferme des explants bien conservés et dont le filtre millipore qui les sépare est colonisé par les cellules néoplasiques d'Ehrlich . Ces cellules n'ont aucune ressemblance avec les cellules tumorales d'origine . En effet, elles se déforment, s'allongent afin de franchir les pores du filtre ( Planche 12 ; 1,2 ) . Dans quelques cas, nous avons pu observer des îlots tumoraux développés à distance de la tumeur ( Planche 12 ; 3 ) .

##### 2.4.2.2 - Associations splénique et tumorale séparées par un filtre millipore

Nous avons examiné 17 associations de ce type . Dans aucun cas, le filtre n'est colonisé par les cellules d'Ehrlich .



Par conséquent, nous n'avons jamais observé d'envahissement tumoral de la rate dans ces conditions . Ce que l'on peut constater en revanche, c'est la traversée du filtre par les cellules spléniques

#### 2.4.3 - Etude des filtres au microscope électronique

Un examen au microscope électronique des filtres et tissus avoisinants a été réalisé en collaboration avec Madame F. Puvion . Cette étude ne concerne pour le moment que l'association foie-tumeur .

Les cellules tumorales d'Ehrlich présentent de nombreux ribosomes et un noyau tourmenté dont le nucléole est hypertrophié ( Planche 13 ; 1 ) . Les hépatocytes du foie ne diffèrent pas de ceux d'organismes adultes . Le microscope électronique nous a permis de confirmer nos observations optiques quant à la survie du tissu embryonnaire et tumoral d'une part et à la localisation des cellules tumorales au niveau du filtre et du foie embryonnaire d'autre part .

Au niveau des filtres, on peut parfois observer quelques hépatocytes qui obturent l'un des pores du filtre, néanmoins cela est rare . En revanche, ce qui est le plus fréquent, c'est l'invasion du filtre par les cellules tumorales . Elles y sont présentes soit sous forme d'amas, soit isolément ( Planche 13 ; 2 et Planche 14 ; 1 ) .

Nous n'avons pas noté de modification de la membrane plasmique de la cellule tumorale au contact de la substance du filtre ( Planche 14 ; 2 ) .

Dans le foie, dans une zone très éloignée du filtre, nous avons retrouvé des cellules tumorales en migration à la fois dans la partie centrale un peu nécrotique ( Planche 15 ; 1 ) et dans la portion périphérique en régénération ( Planche 15 ; 2 ) .

## 2.5 - Interprétation des résultats

### Invasion tumorale au niveau du foie et de la rate embryonnaires en culture organotypique

Comme l'indiquent nos résultats ( Tableau III ), le foie embryonnaire de poulet se cultive bien en culture organotypique . Affronté avec un fragment de tumeur d'Ehrlich, il en favorise indiscutablement la culture qui est impossible en son absence . De plus les éléments cellulaires de la tumeur, dans cette association, ont tendance à envahir le fragment hépatique de proche en proche et même parfois à se ségréger à distance pour réaliser de véritables îlots "métastatiques" . Cette pénétration est observée, sous une forme ou sous l'autre, dans 78 % des cas examinés .

La rate embryonnaire de poulet se cultive aussi très bien, mais elle ne semble favoriser que très faiblement la culture du fragment de tumeur d'Ehrlich associé . Dans aucun cas, la rate n'apparaît infiltrée par les cellules tumorales .

Ces constatations sont en accord avec les travaux sur l'injection intraveineuse de cellules de carcinome d'Ehrlich dans la membrane chorio-allantoïdienne de l'oeuf de poule embryonné, que nous avons précédemment effectués . Nous avons en effet mis en évidence une prédominance des foyers métastatiques au niveau du foie ( 25 % ) et leur absence au niveau de la rate ( 1,3 % ) . Ces expériences apportent des éléments en faveur du rôle du terrain dans la diffusion métastatique .

Pour affermir nos présomptions, nous avons interposé un filtre millipore entre les explants embryonnaire et tumoral, éliminant le contact cellulaire entre ces tissus . Dans ces conditions expérimentales, les cellules tumorales réussissent tout de même à pénétrer le foie, alors qu'elles se nécrosent comme précédemment dans le cas d'une association avec la rate .

Les facteurs responsables de cette attraction ne sont pas déterminés .

Invasion tumorale au niveau d'autres organes embryonnaires de poulet en culture organotypique

Le mésonéphros de poulet permet la multiplication de la tumeur d'Ehrlich de la souris . Les cellules de cette souche tumorale, migrent le plus souvent isolément dans le tissu embryonnaire . Cet organe est favorable à la prolifération des cellules tumorales ( 58 % ), ce qui avait déjà été montré par WOLFF et al., ( 1960 ) . Dans le cas présent, nous avons noté une plus importante migration des cellules cancéreuses au niveau du foie embryonnaire de poulet . Par ailleurs, le pourcentage d'infiltration tumorale du mésonéphros par la tumeur d'Ehrlich concorde bien avec l'intensité de la diffusion métastatique relevée dans le néphros de l'embryon de poulet après injection de cellules néoplasiques par voie intraveineuse ( 12 % ) .

Le poumon embryonnaire de poulet de 9 à 11 jours, permet la survie des cellules tumorales, mais il est assez défavorable à leur multiplication . Le pourcentage d'infiltration tumorale à ce niveau est faible malgré l'élimination du facteur circulatoire . La nature du tissu pulmonaire est peut-être le seul obstacle dans les conditions expérimentales in vitro , mais cela n'apporte pas une explication à la faible fréquence de localisation des foyers métastatiques ( 8,4 % ) in vivo .

La bourse de Fabricius, organe lymphoïde spécifique aux oiseaux et que nous avons prélevé à un stade embryonnaire, permet difficilement la survie des cellules tumorales en culture et se laisse très difficilement envahir par elles . Ce tissu ne semble pas favoriser la migration cellulaire tumorale dans de telles conditions expérimentales . Son comportement est identique à celui de la rate embryonnaire de poulet . Bien entendu, il ne faut pas oublier de signaler le rôle récemment mis en évidence ( GOOD et al., 1966 ; COOPER et al., 1966 ) de la bourse de Fabricius dans les mécanismes immunitaires .

### 3 - ESSAIS PRELIMINAIRES DE CULTURE DE FRAGMENTS TUMORAUX EN PRESENCE D'EXTRAITS DES DIFFERENTS ORGANES

L'étude du comportement de la tumeur d'Ehrlich vis-à-vis des organes embryonnaires du poulet, isolés de l'organisme, en culture organotypique nous a révélé l'existence d'une sorte de "tropisme" des cellules tumorales vers le foie alors que ces cellules ont un comportement inverse vis-à-vis de la rate. Le contact cellulaire entre les deux tissus n'est pas indispensable : nous obtenons les mêmes résultats lorsque nous interposons un filtre millipore entre les organes.

Aussi, nous voulons essayer de préciser quels sont les "facteurs" responsables des différences observées dans les cultures affrontées. Pour cela, nous avons choisi de réaliser l'étude du comportement des fragments tumoraux en présence d'extraits des différents organes.

Nous recherchons dans un premier temps, à mettre en évidence un effet global, c'est à dire à rechercher un éventuel pouvoir de l'organe sur la prolifération tumorale. Des extraits totaux d'organes embryonnaires sont additionnés directement au milieu de culture. Ensuite, compte tenu des observations déjà effectuées par WOLFF et al., ( 1969 ), nous préparons des fractions à partir des extraits acellulaires d'organes embryonnaires de poulet par fractionnement de dialysats ( chromatographie sur échangeurs d'ions ) afin de repérer les substances actives qui permettent la prolifération organotypique cancéreuse in vitro.

#### 3.1 - Préparation des extraits totaux

##### 3.1.1 - Méthode

Après un lavage soigneux, les organes embryonnaires de poulet ( foie ou rate ), sont finement hachés entre deux lames de scalpel repris dans une solution de Hank trypsinisée à 2‰ ( trypsine Difco ).

La trypsinisation se fait à 37°C sous agitation magnétique durant 10 minutes . Après filtration sur compresse de cette solution, le filtrat est centrifugé à 2 500 tours/minute pendant 5 minutes et le surnageant est éliminé . Le culot est remis en suspension et lavé plusieurs fois dans une solution de Tyrode . Finalement, le culot est remis en suspension dans une quantité de Tyrode déterminée en fonction du matériel embryonnaire initialement utilisé . On substitue 1/2 ml de cette suspension au Tyrode habituellement présent dans le milieu de culture standard . La solution de Gey gélosé est ajustée en tenant compte de cette dose d'extrait . Les explants sont cultivés sur le milieu ainsi constitué, durant 7 jours .

### 3.1.2 - Résultats

#### 3.1.2.1 - Associations RATE - TUMEUR sur un milieu contenant de l'extrait de foie

Dans un assez faible pourcentage de cas, nous avons pu remarquer la ségrégation de cellules tumorales et leur pénétration dans la rate embryonnaire . Il ne s'agit pas d'une invasion massive mais nous n'avions jamais observé ces phénomènes lorsque les explants sont cultivés sur un milieu ordinaire ( Planche 14 ; 2,3,4 ) . Nous ne disposons pas actuellement d'un nombre suffisant d'échantillons pour qu'il soit possible d'attribuer ces résultats à nos conditions expérimentales .

#### 3.1.2.2 - Associations FOIE - TUMEUR sur un milieu contenant de l'extrait de rate

Dans ce type d'associations, nous avons pu voir dans un certain nombre de cas que le fragment hépatique se nécrose et qu'il n'est pas envahi par les cellules tumorales qui elles aussi dégèrent . Là encore, il est difficile de conclure car ces résultats ne représentent pas la majorité des cas . Toutefois, ces résultats préliminaires concordent parfaitement avec ceux obtenus avec la technique des cultures affrontées ( Planche 14 ; 1 )

Bien entendu, il ne s'agit là que d'une étape préliminaire à notre expérimentation future et nous abandonnerons probablement cette méthode au profit de celle que nous allons décrire maintenant.

### 3.2 - Préparation des fractions purifiées

#### 3.2.1 - Méthode

##### 3.2.1.1 - Préparation du dialysat

Les foies embryonnaires de poulet, à partir du 18e jour de l'incubation, sont prélevés et additionnés à un volume double d'une solution de Tyrode . Durant l'opération, les organes sont maintenus à une température de 4°C . Ensuite, ils sont broyés dans un homogénéisateur tournant à grande vitesse pendant quelques minutes . Ce broyat est dialysé à 4°C contre un très grand volume d'eau déminéralisée pendant 18 heures, dans des tubes de cellulose Visking . Enfin le dialysat est ramené au volume initial sous vide, dans un évaporateur rotatif .

##### 3.2.1.2 - Fractionnement des dialysats

Le fractionnement des dialysats est effectué soit par chromatographie de gel filtration ou par chromatographie sur des résines à pouvoir d'échange ionique .

#### 3.2.2 - Résultats

Cette étape de notre recherche est à son début . Néanmoins, nous avons pu constater que la fraction " amphotère ", reconnue active dans les travaux de WOLFF et al., ( 1972 ), est déjà très complexe et contient non seulement des acides aminés libres, mais aussi des oligopeptides ( fig. 7 ) .

## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'étude de la diffusion métastatique spontanée, chez l'animal d'expérience est très délicate et toutes les tentatives faites jusqu'alors n'ont pas permis de fournir des indications plus précises que celles que l'on obtient chez l'homme par l'étude des phénomènes pathologiques et la réalisation des autopsies .

Pour essayer de distinguer les différents paramètres qui régissent la diffusion métastatique, il est nécessaire de simplifier le problème en éliminant délibérément la tumeur primitive, source de cellules tumorales et en la remplaçant par une injection intraveineuse de cellules cancéreuses. Si, de cette façon, les foyers tumoraux qui apparaissent dans l'organisme ne méritent pas, stricto sensu, l'appellation de métastases puisqu'il n'y a pas de tumeur primitive, ce sont néanmoins des foyers très analogues à des métastases puisque résultant de l'embolisation de cellules cancéreuses dans la circulation . Idéalement, si l'on veut se rapprocher le plus possible de la réalité, et éviter l'interaction de phénomènes immunologiques en rapport avec l'histocompatibilité, il est nécessaire d'utiliser des cellules cancéreuses autologues par rapport à l'hôte auquel elles sont injectées . Ne disposant pas d'un tel matériel, nous avons choisi d'effectuer les injections intraveineuses de cellules cancéreuses d'Ehrlich chez l'oeuf de poule embryonné . En effet, le fait que le système utilisé soit hétérologue n'est pas un inconvénient en la matière car l'oeuf de poule embryonné est incompetent sur le plan immunologique ce qui élimine l'intervention de réactions d'histocompatibilité . Cela ressort des travaux de certains auteurs ( MURPHY et al., 1914 ; GEBAUER-FUELNEGG, 1932 ) qui ont démontré que les réactions immunologiques n'existent pas ou sont minimales chez l'embryon de poulet jusqu'au 18e jour de l'incubation .

En revanche l'apparition ultérieure de réactions immunologiques rend compte de la constatation selon laquelle les foyers tumoraux obtenus par de telles inoculations intraveineuses avant l'éclosion, sont susceptibles de disparaître complètement après l'éclosion ainsi que l'ont mis en évidence HUMPHREYS (1960) et MENKES et SANDOR ( 1962, 1965 ).

Ce sont ces raisons, entre autres, qui nous ont incité à pratiquer l'injection intraveineuse de cellules cancéreuses hétérologues au 10e jour de l'incubation et à étudier ce qui en résultait chez l'embryon de poulet avant que la date de l'éclosion ne soit atteinte .

La première constatation qui peut être faite à l'analyse de nos résultats, réside dans le fait qu'un pourcentage non négligeable d'embryons est indemne de tout foyer tumoral viscéral malgré l'inondation de leur système vasculaire par un très grand nombre de cellules cancéreuses . Cela démontre que l'organisme receveur met en jeu des mécanismes de défense encore très mal connus, mais certainement de nature immunologique et liés à une néoantigénicité de la cellule cancéreuse . C'est d'ailleurs une constatation quotidienne en pathologie humaine que certains cancers, chez certains patients, ne s'accompagnent pas de métastases à distance, alors que chez d'autres de telles métastases sont profuses . Autrement dit, la mise en circulation de cellules cancéreuses, soit spontanément à partir d'une tumeur, soit expérimentalement par inoculation directe, ne signifie pas qu'il en résultera inéluctablement des métastases ; nos résultats rapportés ici en sont la démonstration expérimentale .

Nous avons déjà par ailleurs insisté sur la seconde constatation expérimentale selon laquelle la répartition viscérale des foyers tumoraux, obtenus après inoculation intraveineuse de cellules cancéreuses, est très hétérogène, ce qui suggère qu'il existe une sélectivité soit dans la dispersion des cellules cancéreuses dans les différents organes, soit dans la multiplication des cellules au niveau de ces derniers .

La répartition que nous rapportons est semblable à celles dont font état MENKES et SANDOR ( 1965 ), LEIGHTON ( 1967 ), EASTY et al., ( 1969 ), ce qui incline à penser que cette répartition obéit à des lois et n'est pas le fruit du hasard . C'est ainsi qu'il y a une différence très importante entre le pourcentage d'envahissement du foie ( 25 % ) et celui de la rate ( 1,3 % ) . Il est infiniment peu probable que cette différence soit liée à une différence d'apport de cellules cancéreuses . Si le foie est très vascularisé, la rate l'est également et les deux organes possèdent un réseau capillaire très dense et très perméable aux cellules cancéreuses . On peut donc en tirer la conclusion que dans le système expérimental employé, le foie favorise la croissance des foyers tumoraux alors que la rate y est hostile . Il est intéressant de souligner que ce résultat n'est pas propre au système expérimental utilisé puisque des études antérieures de DRIESSENS et al., (1963), avaient permis de montrer que la splénectomie effectuée préalablement à l'injection des cellules cancéreuses, favorisait la diffusion métastatique ainsi engendrée . Enfin ce qui est vrai expérimentalement pour l'embryon de poulet et le rat, l'est aussi probablement pour l'homme chez qui les métastases spléniques sont très rares en regard de la fréquence des métastases osseuses, pulmonaires ou hépatiques par exemple .

Ainsi, à l'échelon de l'organisme l'importance de la diffusion métastatique est liée à la néoantigénicité de la cellule cancéreuse et à la réaction immunologique de l'organisme . Mais ce n'est pas tout : vis-à-vis des cellules cancéreuses, chaque organe a un comportement qui lui est propre .

Nous nous sommes cependant étonnés de n'observer qu'un pourcentage peu élevé de métastases pulmonaires ( 8,4 % ), car il est bien connu qu'en pathologie spontanée et en pathologie expérimentale dans d'autres systèmes, le parenchyme pulmonaire constitue au contraire un site métastatique préférentiel . Tout comme le foie en effet, les poumons représentent un " filtre " obligatoire particulièrement riche en capillaires sanguins, et ainsi susceptibles

de recueillir de nombreuses cellules tumorales en circulation ( EASTY et al., 1970 ). A ce sujet, il ne faut toutefois pas oublier les conditions de notre expérimentation qui est effectuée chez des embryons dont les poumons n'ont pas de pouvoir fonctionnel, ce qui les rend très différents, en ce qui concerne l'hémodynamique, du poulet éclos . Cela n'est d'ailleurs pas un argument formel puisque selon MENKES et SANDOR ( 1965 ) des métastases pulmonaires existant durant la période embryonnaire peuvent disparaître après l'éclosion . Ces mêmes auteurs ont de plus précisé que l'inoculation plus précoce de cellules cancéreuses ( au 4e jour de l'incubation ) n'entraînait pas un taux plus élevé de métastases pulmonaires . Force nous est donc de rester à notre première interprétation selon laquelle pour chaque variété de cellule cancéreuse, il existe une affinité particulière de chacun des viscères . La pathologie humaine est là pour nous renforcer dans cette interprétation puisque l'on sait que pour un cancer déterminé il existe des sites métastatiques préférentiels qui sont variables selon les cancers . Ainsi le tissu pulmonaire de l'embryon de poulet serait un mauvais " terrain " pour la cellule cancéreuse d'Ehrlich . Si nous employons ici le conditionnel c'est qu'il demeure des faits troublants en regard de cette conception . En effet lorsque nous avons injecté des cellules d'Ehrlich dans la cavité coelomique des embryons au 3e jour d'incubation, nous avons constaté une fréquente migration des cellules dans les poumons .

Un autre intérêt de l'oeuf de poule embryonné réside dans le fait qu'il possède une membrane chorio-allantoïdienne qui s'est révélée à l'usage un site très précieux pour détailler le phénomène de l'invasion tumorale à partir des cellules cancéreuses embolisées dans les nombreux capillaires qu'elle contient . La structure tissulaire de cet organe est en effet très simple, ce qui nous a incité à examiner le phénomène au microscope électronique, espérant pouvoir analyser les modalités du franchissement des parois capillaires par les cellules cancéreuses, ainsi que leurs rapports avec les membranes basales .

Nos observations sont ici parfaitement superposables à celles faites par FONCK-CUSSAC et al., ( 1969 ) au niveau d'un vaisseau pulmonaire humain et à celles de MARCHESI et GOWANS ( 1964 ) en ce qui concerne les modifications des membranes basales au cours de la leucodiapédèse . Tous les aspects observés permettent se suspecter la mise en jeu d'un facteur biochimique lytique qui pourrait être de nature enzymatique . Il y a là matière à une étude d'histochimie ultrastructurale .

Nous avons précédemment montré que les foyers tumoraux analogues à des métastases, qui apparaissent après injection intraveineuse de cellules cancéreuses ne sont pas distribuées au hasard, mais qu'il y a bien au contraire une véritable sélectivité dans l'envahissement des différents viscères . Nous avons exposé les arguments, qui à notre sens, sont en faveur d'un rôle direct des organes dans ce phénomène . Mais la démonstration véritable ne peut en être faite que si l'on élimine les autres paramètres qui interviennent et tout particulièrement l'organisme en temps qu tel ainsi que le système circulatoire . C'est pourquoi nous avons adopté le système des cultures organotypiques in vitro avec affrontement de deux seuls éléments dont, en définitive, on veut étudier l'interaction, c'est à dire un fragment tumoral et un fragment d'un organe déterminé . Cela nous a fourni la démonstration que nous cherchions puisque, d'une façon très constante nous avons observé que le foie et la tumeur s'associaient volontiers, les éléments de cette dernière pénétrant le fragment hépatique, alors qu'à l'inverse, avec la rate la survie du fragment tumoral fut à peine assurée . D'ailleurs WOLFF et al. (1968) avaient déjà montré combien le foie embryonnaire de poulet jouait un rôle bénéfique dans la survie de différentes tumeurs en culture organotypique . Pour WOLFF et al. (1969), les cellules cancéreuses se nourrissent aux dépens de l'organe associé qui lui-même puise les éléments nutritifs dans le milieu de culture. Il faut noter que si cela nous est apparu vrai pour le foie et le mésonéphros, il n'en a pas été de même avec la rate et la bourse de Fabricius . Il faut peut être en trouver la raison dans le fait qu'il s'agit d'organes du système hématopoïétique, jouant un rôle dans les phénomènes immunitaires .

Même lorsque les fragments embryonnaire et tumoral cultivés in vitro sont séparés par un filtre millipore, la migration des cellules d'Ehrlich se fait toujours en direction du foie et non de la rate . C'est dans le but de mettre en évidence les facteurs responsables des différences observées que notre activité de recherche se poursuit actuellement par l'étude du comportement des fragments tumoraux en présence d'extraits des différents organes, compte tenu des travaux de CROISILLE et WOLFF ( 1967 ), WOLFF et al., (1972), concernant l'extraction de fractions actives de foie de poulet c'est à dire de fractions susceptibles de maintenir la culture de tumeurs .

## CONCLUSION G E N E R A L E

L'injection de cellules du carcinome ascitique d'Ehrlich de la souris dans une veine de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de poulet au 11e jour de l'incubation permet d'observer chez 70 % des embryons décédés ou sacrifiés entre le 17e et le 21e jour d'incubation des foyers tumoraux analogues à des foyers métastatiques dans les viscères intra-embryonnaires ou extra-embryonnaires. Cet envahissement le plus souvent polyviscéral marque une très nette sélectivité d'invasion des différents organes par les cellules tumorales .

C'est ainsi que le foie est le plus intensément lésé, puisque l'on peut apprécier que le pourcentage d'intensité métastatique est de 25 % à son niveau, alors que la rate ne l'est pratiquement jamais. Entre ces deux extrêmes, se placent l'encéphale, le coeur, le néphros, les poumons . En raison de la fréquence des foyers tumoraux dans la membrane chorio-allantoïdienne et la nature du tissu qui la constitue essentiellement, nous avons pu y préciser la cinétique évolutive des cellules injectées et certains stades de l'invasion tumorale, notamment en ce qui concerne les rapports des cellules cancéreuses et des capillaires .

La traversée de la barrière capillaire par ces cellules examinées au microscope électronique se fait successivement par apposition à la paroi externe du vaisseau, " dissolution " de la membrane basale au contact, endothélialisation puis embolisation immédiate, sans thrombose associée.

Dans ces conditions expérimentales, certains organes et tout particulièrement le foie, constituent un "terrain " très favorable à l'implantation des cellules cancéreuses circulantes et à leur multiplication en nodules métastatiques tandis que d'autres sont hostiles, la rate notamment, pour des raisons anatomiques ou biologiques d'affinité cellulaire mal connues .

Cela suggère que la diffusion métastatique des cancers est régie non seulement par des phénomènes immunitaires, mais aussi par des conditions locales représentées par les différents viscères.

La culture affrontée in vitro de la tumeur d'Ehrlich et d'un organe embryonnaire nous a permis d'éliminer certains facteurs, les conditions circulatoires ainsi que le système immunitaire, pouvant intervenir dans le phénomène de la prédominance métastatique. Le foie embryonnaire de poulet se cultive bien en culture organotypique. Affronté avec un fragment de tumeur d'Ehrlich, il en favorise indiscutablement la culture qui est impossible en son absence. De plus les éléments cellulaires de la tumeur, dans cette association, ont tendance à envahir le fragment hépatique de proche en proche et même parfois à se ségréger à distance pour réaliser de véritables " îlots métastatiques ". Cette pénétration est observée sous une forme ou sous l'autre, dans 78 % des cas examinés.

La rate embryonnaire de poulet se cultive aussi très bien, mais elle ne semble favoriser que très faiblement la culture du fragment de tumeur d'Ehrlich associé. Dans aucun cas la rate n'apparaît infiltrée par les cellules tumorales.

Ces constatations représentent à notre sens la démonstration que dans la localisation des métastases viscérales d'une tumeur déterminée, le terrain local constitue sinon un facteur exclusif, du moins essentiel, ainsi que nous l'avions avancé à titre d'hypothèse, à la suite de nos travaux sur l'injection intraveineuse de cellules du carcinome d'Ehrlich dans une veine de la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet.

Pour essayer de préciser les facteurs exacts responsables des différences observées, la meilleure voie d'approche en la matière semble résider dans l'étude du comportement des fragments tumoraux en présence d'extraits des différents organes.

BIBLIOGRAPHIE

## B I B L I O G R A P H I E

A DENIS, L., Etudes expérimentales sur la diffusion métastatique des tumeurs malignes . Thèse Doct. Médecine. (Lille), (1962).

BENDER, D.H., FRIEDGOOD, C.E. et LEE, H.F., Transplantation of heterologous tumor by the intravenous inoculation of the chick embryo . Cancer Res., 9, 61-64 (1949 a).

BENDER, D.H., FRIEDGOOD, C.E. et LEE, H.F., Transplantation of heterologous tumors . Cancer Res., 9, 65 (1949 b).

BUEKER, E., Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system . Anat. Record., 102, 369-390 (1948).

CLARKSON, B., KATZ, A., DANN, M.A. et KARNOFSKY, D.A., Behavior of P 388 mouse leukemia in the chick embryo and hatched chick . J. Natl. Cancer Inst., 32, 471-505 (1964).

COOPER, M.D., PETERSON, R.D.A., SOUTH, M.A. et GOOD, R.A., The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. J. Exp. Med., 123, 75-80 (1966).

CROISILLE, Y., MASON, J., WOLFF, Em. et WOLFF, Et., Analyse biochimique des facteurs déterminant la croissance de tumeurs cancéreuses humaines en culture d'organes in vitro . Europ. J. Cancer., 3, 371-379 (1967).

DRIESSENS, J., CLAY, A., VANLIERENBERGHE, J. et ADENIS, L., Action de l'ablation des tumeurs greffées sur leur diffusion métastatique. I. Chloroleucémie transplantable du rat blanc de Ch. Oberling et M. Guérin. C.R. Soc. Biol., 154, 1233-1235 (1960).

DRIESSENS, J., ADENIS, L., VANLERENBERGHE, J. et CLAY, A., Action de l'ablation des tumeurs greffées sur leur diffusion métastatique . II. Epithélioma lymphotrope de M. Guérin. C.R. Soc. Biol., 155, 1942-1944 (1961).

DRIESSENS, J., ADENIS, L., GLAUX, G. et QUANDALLE, P., Destinée immédiate des cellules cancéreuses injectées par voie intraveineuse chez l'animal normal . I. Etude microscopique et par radioactivité de l'épithélioma de Guérin du rat blanc. C.R. Soc. Biol., 156, 1653-1656 (1962).

DRIESSENS, J., ADENIS, L., VANLERENBERGHE, J. et CLAY, A., Injections intraveineuses de broyat d'épithélioma de Guérin. V. Chez le rat ayant subi un blocage du système réticulo-endothélial par le bleu Trypan. C.R. Soc. Biol., 157, 559-561 (1963a).

DRIESSENS, J., CLAY, A., VANLERENBERGHE, J. et ADENIS, L., Nouvelles recherches expérimentales sur la diffusion métastatique des tumeurs malignes. Bull. Ass. Franç. Et. Cancer, 50, 183-194 (1963b).

DRIESSENS, J., CLAY, A., VANLERENBERGHE, J., ADENIS, L., GLAUX, G. et QUANDALLE, P., Injections intraveineuses de broyat d'épithélioma de Guérin. VI. Chez le rat ayant reçu une application préalable de rayons X. C.R. Soc. Biol., 157, 1981-1983 (1963c).

DRIESSENS, J., CLAY, A., VANLERENBERGHE, J., ADENIS, L. et QUANDALLE, P., Action de l'ablation des tumeurs greffées sur leur diffusion métastatique. III. Ablations incomplètes itératives de l'épithélioma de Guérin . C.R. Soc. Biol., 158, 731-732 (1964).

DRIESSENS, J., VANLERENBERGHE, J., CLAY, A., ADENIS, L. et QUANDALLE, P., Action de l'ablation des tumeurs greffées sur leur diffusion métastatique. IV. Ablation complète du carcinome de Walker. C.R. Soc. Biol., 159, 1676-1677 (1965a).

DRIESSENS, J., ADENIS, L., CLAY, A. et VANLERENBERGHE, J., Injections intraveineuses de cellules d'hépatome ascitique de Zajdela chez le rat Wistar. I. Chez le rat neuf. C.R. Soc. Biol., 159, 1159-1161 (1965b).

DRIESSENS, J., CLAY, A., ADENIS, L. et VANLERENBERGHE, J., Injection intraveineuse de broyat d'épithélioma de Guérin. VII. Chez le rat Wistar ayant subi un blocage du système réticulo-endothélial par le dioxyde de thorium. C.R. Soc. Biol., 160, 2069-2070 (1966).

EASTY, G.C., EASTY, D.M. et TCHAO, R., The distribution of heterologous tumor cells in chick embryos following intravenous injection. Europ. J. Cancer, 5, 297-305 (1969a).

EASTY, G.C., EASTY, D.M. et TCHAO, R., The growth of heterologous tumors cells in chick embryos. Europ. J. Cancer, 5, 287-295 (1969b).

EHRlich, P., Experimentelle Carcinom Studien am Maissen. Z. Arztl. Fortbild, 3, 205-210 (1906).

EICHORN, E.A., Technique for intravenous inoculation of chick embryos. Science, 92, 245-246 (1940).

FLOREY, H.W. et GRANT, L.H., Leucocyte migration from small blood vessels stimulated with ultraviolet light : an electron microscope study . J. Path. Bact., 82, 13-17 (1961).

FONCK-CUSSAC, Y., DELAGE, J. et PETIT, J., Observations ultrastructurales sur le mode d'implantation endovasculaire des métastases d'un cancer bronchique . Poumon, 25, 231-234 (1969).

GEBAUER-FUELNEGG, E., Formation of antibodies in fertile hens eggs. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 29, 529-530 (1932).

GLICK, B., The bursa of Fabricius and the development of immunologic competence. In : The thymus in immunobiology, edited by R.A. GOOD and A.E. GABRIELSEN . New York, Hoeber, p. 348 . (1964).

GOOD, R.A., GABRIELSEN, A.E., PETERSON, R.D.A., FINSTAD, J., COOPER, M.D., The development of the central and peripheral lymphoid tissue : ontogenetic and phylogenetic considerations . In : CIBA Symposium on the Thymus : Experimental and clinical studies, edited by G.E.W. WOLSTENHOLME and R. PORTER . London, J.A. Churchill, p. 181. (1966)

GREEN, H. et LORINCZ, A.L., Growth of mouse tumor in the chick embryo with retention of capacity of the chick to form antibody to the tumor cells in later life. Nature, 178, 146-147 (1956).

GREEN, H. et LORINCZ, A.L., The role of a natural antibody in the rejection of mouse tumor by the chick embryo. J. Exptl. Med., 106, 111-116 (1957) .

HUMPHREYS, T., The fate of Ehrlich ascites cells injected intravenously into chick embryos. Plastic Reconstruc. Surg., 26, 118-120 (1960).

KARNOFSKY, D.A., RIDGWAY, L.P. et PATTERSON, P.A., Tumor transplantation to the chick embryo. Ann. N.Y. Acad. Sci., 55, 313-329 (1952).

KAUTZ, J., Differential invasion of embryonic chick tissues by mouse sarcomas 180 et 37 . Cancer Res., 2, 180-187 (1952).

LAMOTTE, M., Initiation aux méthodes statistiques en Biologie. Edit. Masson et Cie, Paris, p. 60-69 (1962).

LEE, H .F., STAVITSKY, A.B. et LEE, P., A chick embryo technic for intravenous and chemotherapeutic studies, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 61,

LEIGHTON, J., The appearance of disseminated minute tumor nodules in the chorioallantoic membrane of the chick following intravenous inoculation of ascites tumor cells. Cancer Res., 23, 148-152 (1963).

LEIGHTON, J., Invasion and metastasis of heterologous tumors in the chick embryo. In: F. Homburger (ed.), Progress Experimental Tumor Research, Vol. 4, p. 98-125, S. Karger, A.G., Basel (1964).

LEIGHTON, J., The spread of cancer. In: H. Booker (ed.), The spread of cancer explored in the embryonated egg, p. 115-192, Academic Press, New York (1967).

LEVI-MONTALCINI, R., et HAMBURGER, V., Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J. Exp. Zool., 116, 321-340 ( 1951) .

LUFT, J.M., Improvement in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409-414 (1961).

MARCHESE, V.T. et GOWANS, J.L., The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes : an electron microscopic study. Proc. roy. Soc. B., 159, 283-290 (1964).

MASON, J., WOLFF, Em., WOLFF, Et., " WOLFF factors" from chick embryo mesonephros and liver or yeast. In: Homeostat. Regulators Ciba found. Symp. London. London J. S.A. Churchill Ltd. (1969).

MENKES, B., et SANDOR, S., Experimental investigations concerning the effect of homologous and heterologous cells introduced into the blood stream of embryonic organisms. II. The behavior of Ehrlich's ascites tumor cells introduced into the circulation of chick embryos. Rev. Ştiinţ. Med., 7, 163-165 (1962).

MENKES, B., et SANDOR, S., Tumoral heterografts in the developing chick embryo. Rev. Roumaine Embryol., Cytol., Embryol., 2, 57-58 (1965).

MÖLLER, E., Isoantigenic properties of tumors transgressing histocompatibility barriers of the H-2 system. J. Nat. Cancer Inst., 33, 979-982 (1964) .

MOULTON, Y., Ultrastructure de la barrière capillaire dans l'invasion tumorale. Etude expérimentale au niveau de l'oeuf de poule embryonné. Thèse Doct. Médecine (Lille), (1970).

MOULTON, Y., DEMAILLE, A. et DRIESSENS, J., Etude expérimentale de la diffusion des cellules cancéreuses dans l'oeuf de poule embryonné. II. La membrane chorio-allantoïdienne au microscope électronique. C.R. Soc. Biol., 164, 2041-2044 (1970).

MOULTON, Y., DEMAILLE, A. et DRIESSENS, J., Etude expérimentale de la diffusion des cellules cancéreuses dans l'oeuf de poule embryonné. III. Au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne en microscopie électronique. C.R. Soc. Biol., 164, 2528-2532 (1970).

MURPHY, J.B., Transplantability of tissues to the embryo of foreign species. J. Exp. Med., 17, 482-493 (1913).

POLK, A., BUDDINGH, G.J. et GOODSPATURE, F., Experimental study of complement and hemolytic amboceptor introduced with chick embryos. Am. J. Path., 14, 71-81 (1938).

READE, P.C., JENKIN, C.R. et TURNER, K.J., The synthesis by foetal chicks and rats of serum proteins having some properties of the immunoglobulins. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 43, 699-712 (1965).

REYNOLDS, E.S., The use of lead citrate at high Ph as an electron opaque strain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-213 (1963).

ROUS, P. et MURPHY, J.B., Tumor implantations in the developing embryo. J. Am. Med. Ass., 56, 741-742 (1911).

RUTH, R.H., ALLEN, C.P., WOLFE, H.R., The effect of thymus on lymphoid tissue. In: The thymus in immunobiology, edited by R.A. GOOD and A.E. GABRIELSEN . New York, Hoeber, p. 183 .

SIGOT, M.F., Etudes sur la culture organotypique de tumeurs animales associées à des organes embryonnaires de poulet et ses applications. Thèse Doct. Sciences (Paris) (1969) .

TAYLOR, A., CARMICHAEL, N., The effect on the embryo of continued serial tumor transplantation in the yolk sac . Cancer Res., 9, 498-503 (1949).

THIERSCH, J.B., Attempts to transmit leucaemia of man and of mice to the chick embryo and to the young chick by the amniotic and intravenous routes, Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 22, 57 (1944).

VANLERENBERGHE, J., TRUPIN, N., ADENIS, L., CAPPELAERE, P., BOCQUET, G. et DRIESSENS, J., Fixation de cellules épithéliomateuses circulantes par le foie de rat isolé et perfusé. I. Rat normal. C.R. Soc. Biol., 159, 2376-2378 (1965).

VLAEMINCK, M.N., Etude expérimentale sur oeuf de poule embryonné de la diffusion des tumeurs malignes. Mémoire de D.E.A. de Biologie Cellulaire ( Faculté des sciences de Lille ) (1970).

VLAEMINCK, M.N., ADENIS, L., et DRIESSENS, J., Etude expérimentale de la diffusion des cellules cancéreuses dans l'oeuf de poule embryonné. I. Au niveau de la membrane chorio-allantoïdienne en microscopie photonique. C.R. Soc. Biol., 161, 1029-1031 (1970).

VLAEMINCK, M.N., ADENIS, L., et DRIESSENS, J., Etude expérimentale de la diffusion des cellules cancéreuses dans l'oeuf de poule embryonné. IV. Répartition viscérale des foyers tumoraux. C.R. Soc. Biol., 165, 326-328 (1971).

VLAEMINCK, M.N., ADENIS, L., DEMAILLE, A., et MOUTON, Y., Experimental study of cancer cells diffusion in embryonated chick eggs. Dissemination, microscopy and ultrastructure of tumor nodules. Communication International Symposium on Chemotherapy of Cancer Dissemination and Metastasis, Milan, 1972 .

VLAEMINCK, M.N., ADENIS, L., MOUTON, Y., et DEMAILLE, A., Etude expérimentale de la diffusion métastatique chez l'oeuf de poule embryonné. Répartition, microscopie et ultrastructure des foyers tumoraux. Int. J. Cancer., 10, 619-631 (1972).

VLAEMINCK, M.N., et ADENIS, L., Etude en culture organotypique du comportement de la tumeur d'Ehrlich associée à du foie et de la rate embryonnaires de poulet. C.R. Acad. Sc., 275, 951-954 (1972).

WOLFF, Et. et HAFEN, K., Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Texas Rep. Biol. Med., 10, 463-472 (1952).

WOLFF, Et., Essais de culture d'une tumeur de souris sur les organes embryonnaires de poulet cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., 242, 1537-1538, (1956) .

WOLFF, Et., La culture de tumeurs sur des organes embryonnaires explantés in vitro . Rev. Med. Bruxelles, 36, 2235-2243 (1956).

WOLFF, Et. et WOLFF, Em., Les résultats d'une nouvelle méthode de culture de cellules cancéreuses in vitro. Rev. Fr. Etudes clin. Biol. 3, 945-951 (1958).

WOLFF, Et., et WOLFF, Em., Mise en évidence de substances favorables à la prolifération de cellules cancéreuses dans le rein embryonnaire de poulet. C.R. Acad. Sci., 250, 4076-4077 (1960).

WOLFF, Et., et WOLFF, Em., Comment un sarcome de souris se nourrit-il des tissus du rein embryonnaire de poulet , C.R. Soc. Biol., 154, 2182-2184 (1960) .

WOLFF, Et., et WOLFF, Em., Culture de cancers humains sur du rein embryonnaire de poulet explanté in vitro. Presse Médicale, 25, 1123-1126 (1961).

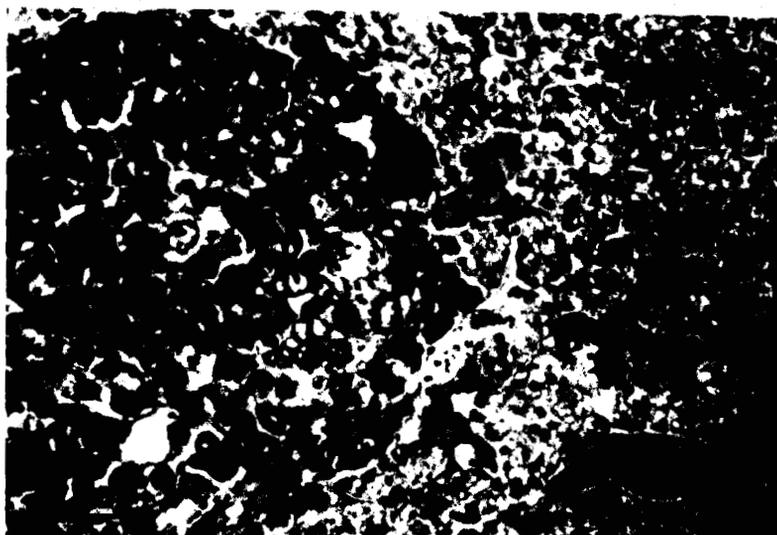
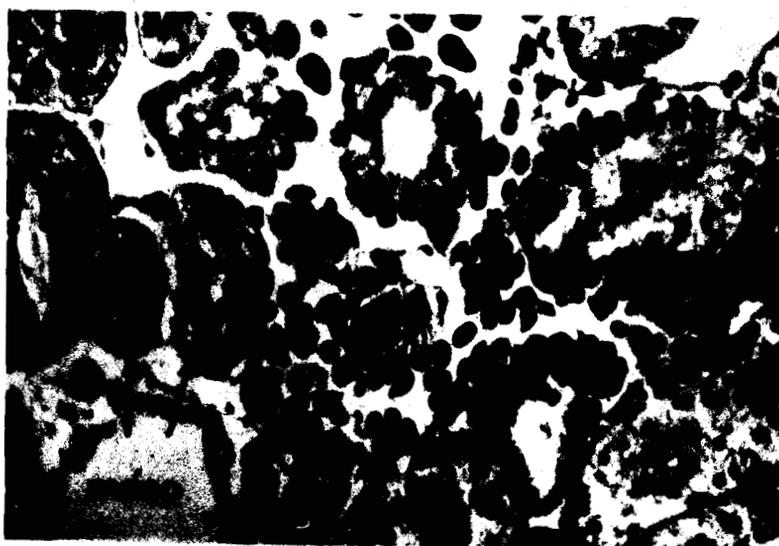
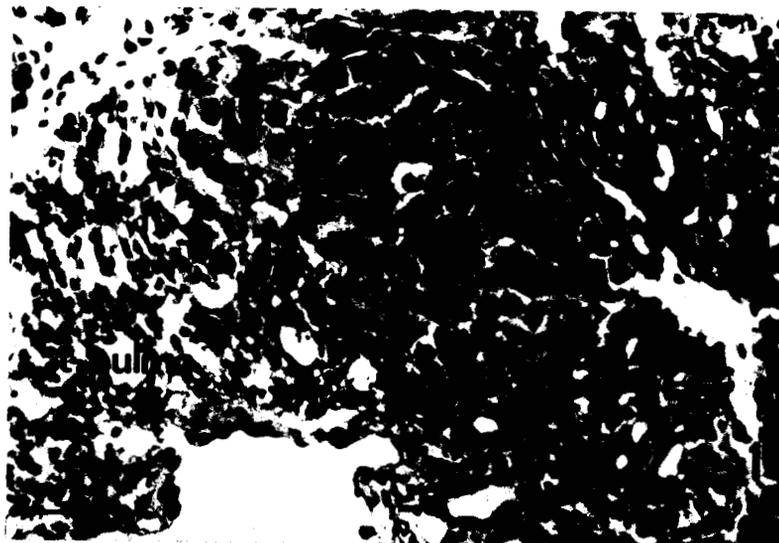
WOLFF, Et., et WOLFF, Em., Le rôle du mésonéphros de l'embryon de poulet dans la nutrition de cellules cancéreuses. II. Etude par la méthode de la membrane vitelline. J.Embryol. Exp. Morph.,9, 678-690 (1961).

WOLFF, Em., Adaptation de quatre nouvelles souches de cancers humains à la culture organotypique in vitro. C.R. Soc. Biol., 156, 1217-1219 (1962).

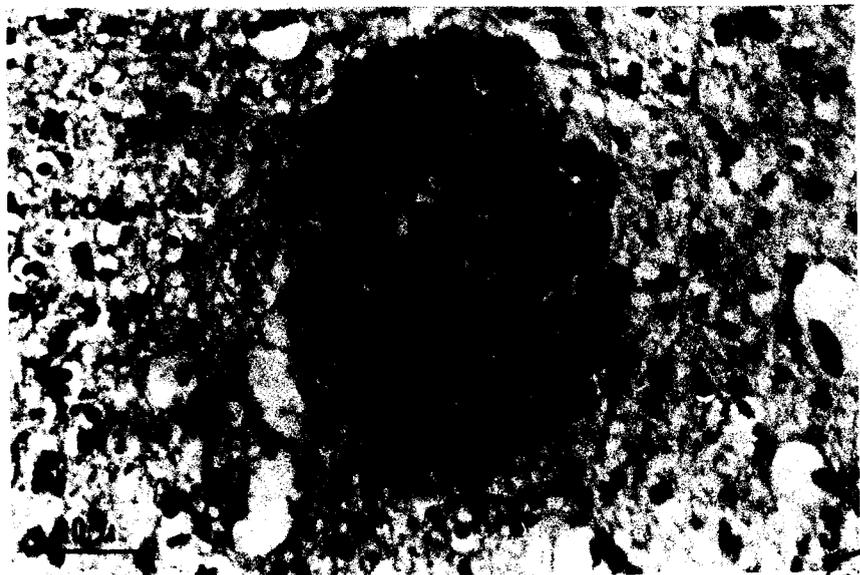
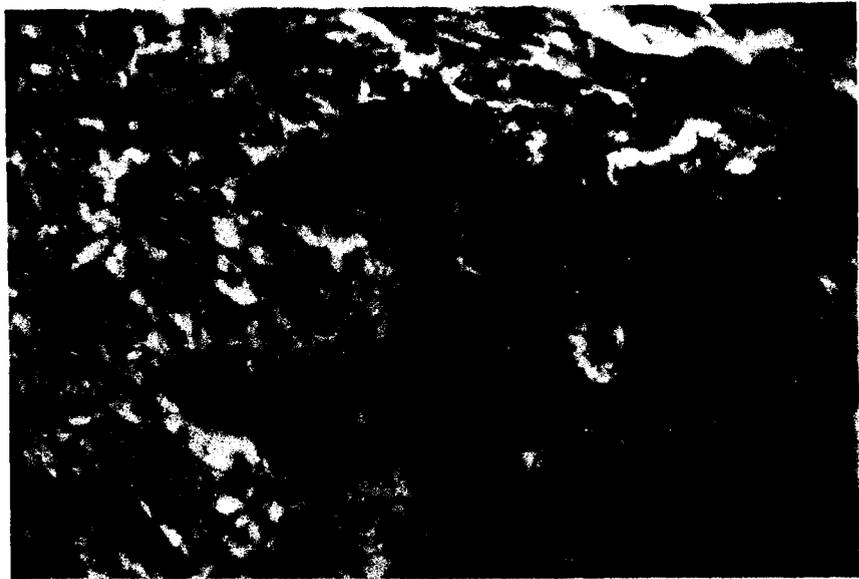
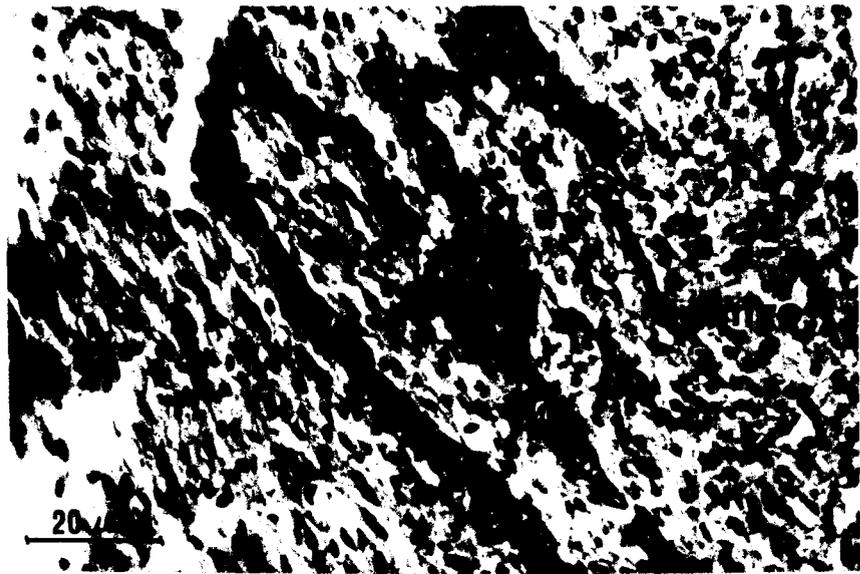
WOLFF, Et., Les étapes de la recherche biochimique sur les cultures organotypiques de tumeurs malignes humaines . Arch. Anat. Histol. Embryol., 51, 789-798 (1968).

WOLFF, Et., et WOLFF, Em., Embryologie et Cancérologie. Essai méthodique et expérimental. Dans: Les apports récents des cultures et des greffes en Biologie animale par WOLFF Et. et P. BRIEN, p.248 Edit. Masson, Paris (1971).

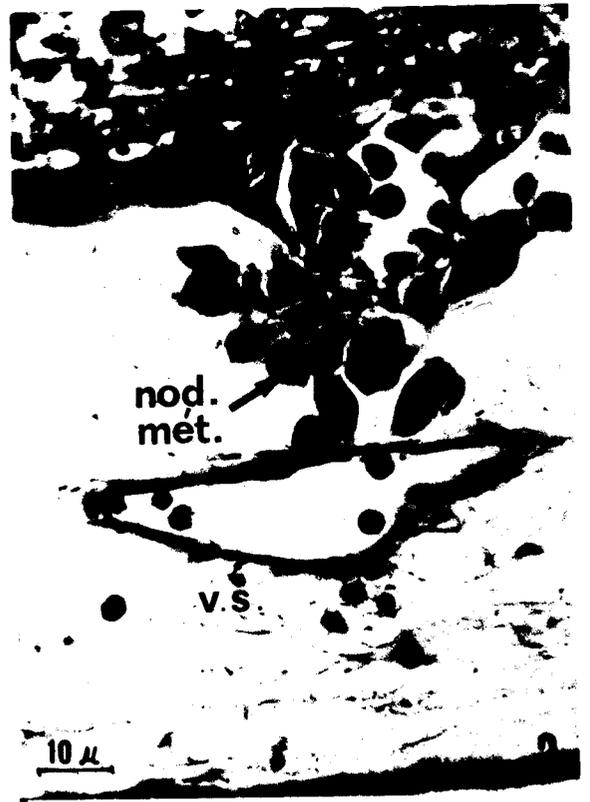
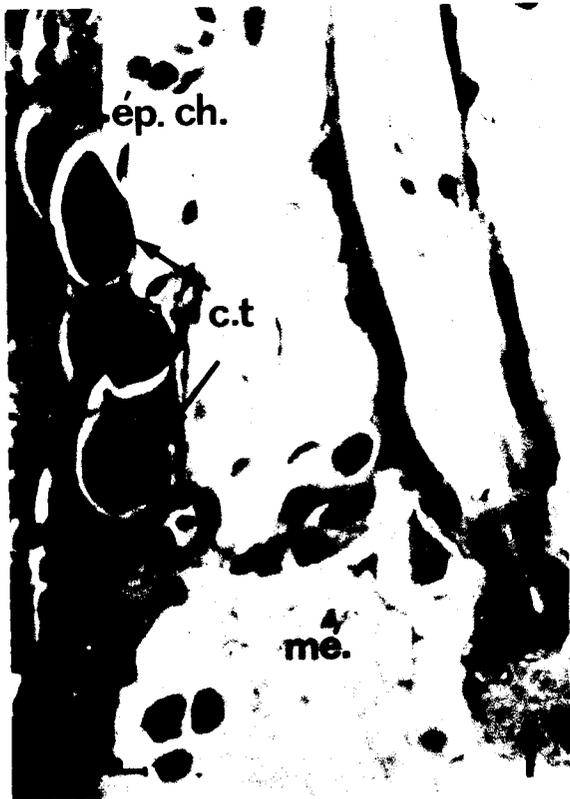


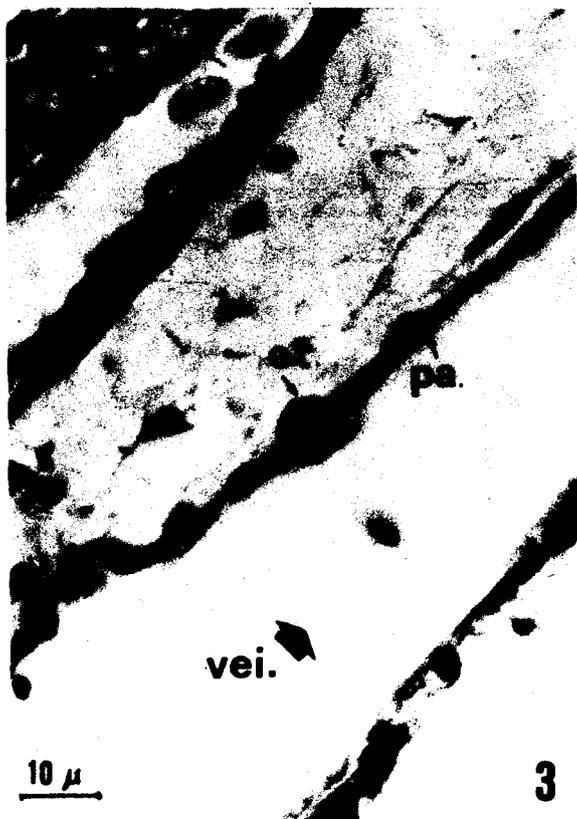
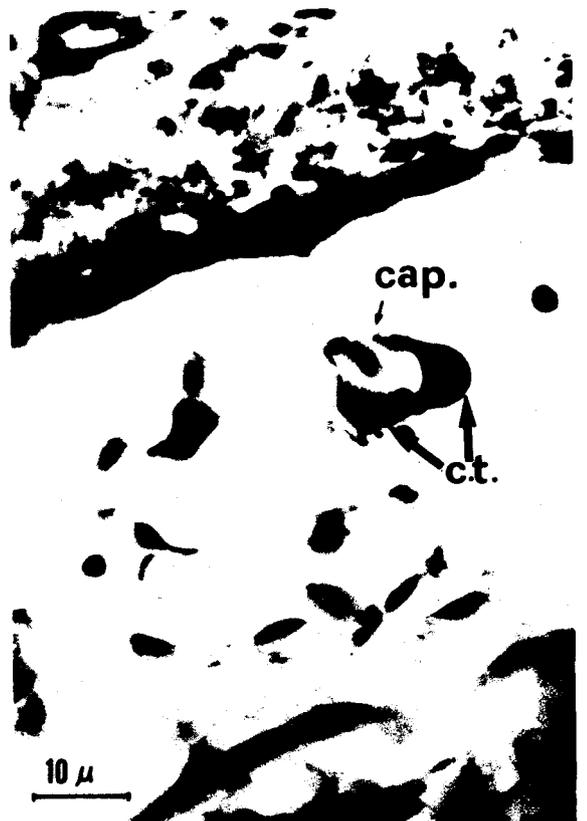
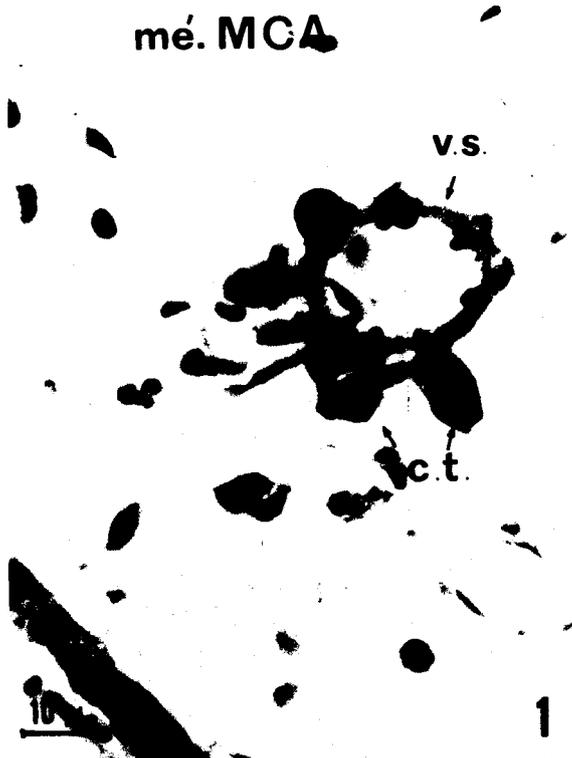


BUS  
LILLE

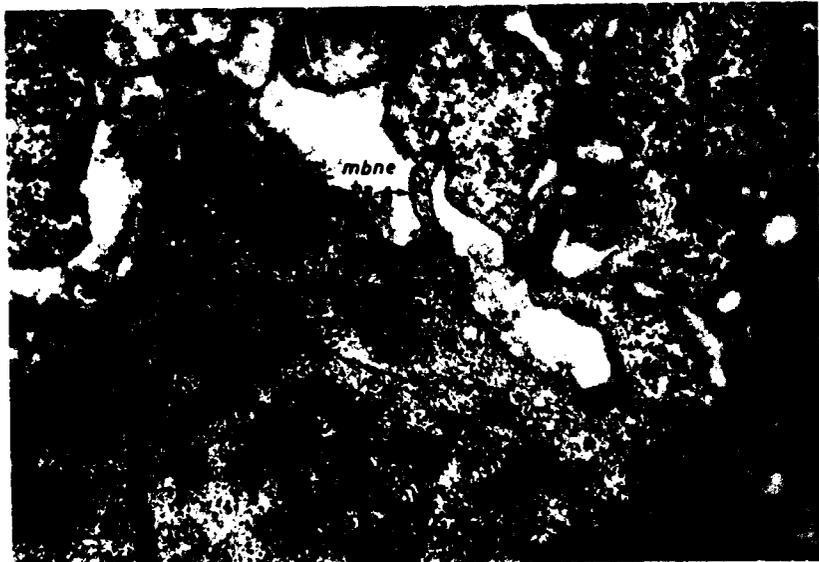
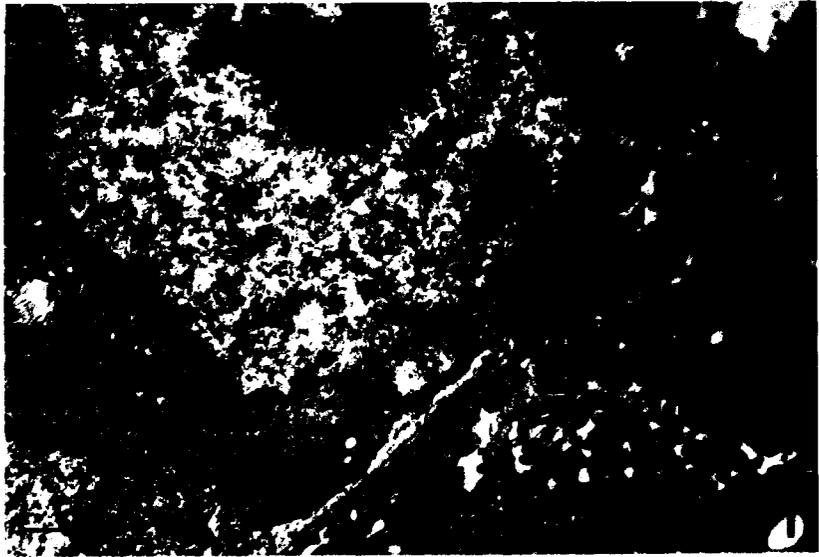


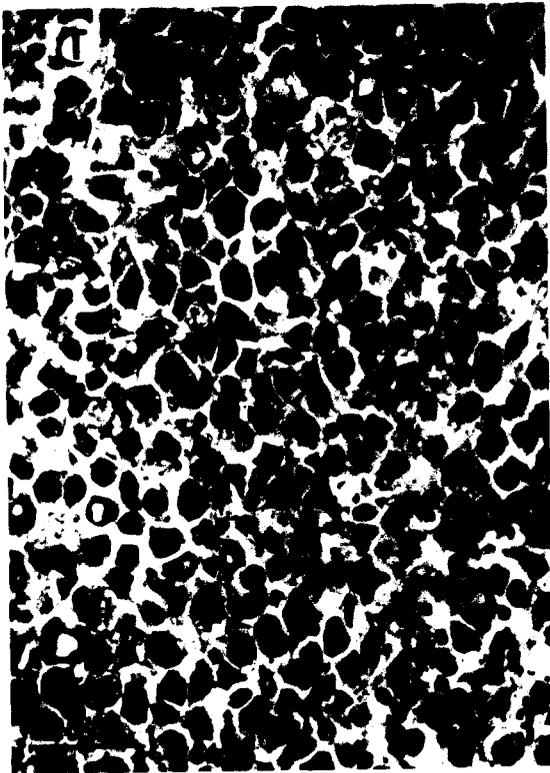
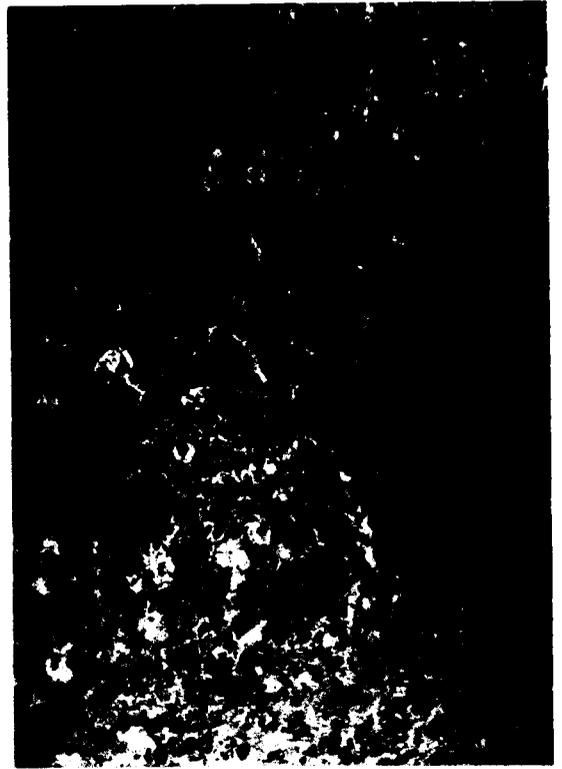
BUS  
VILLE



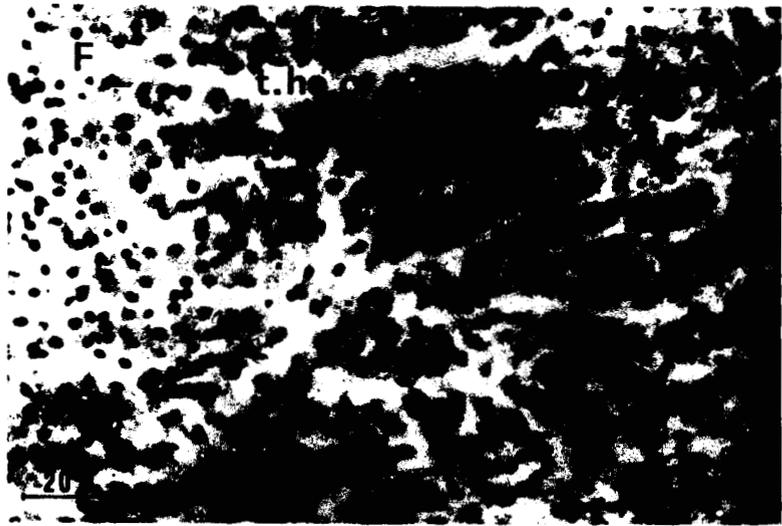


BUS  
L1111

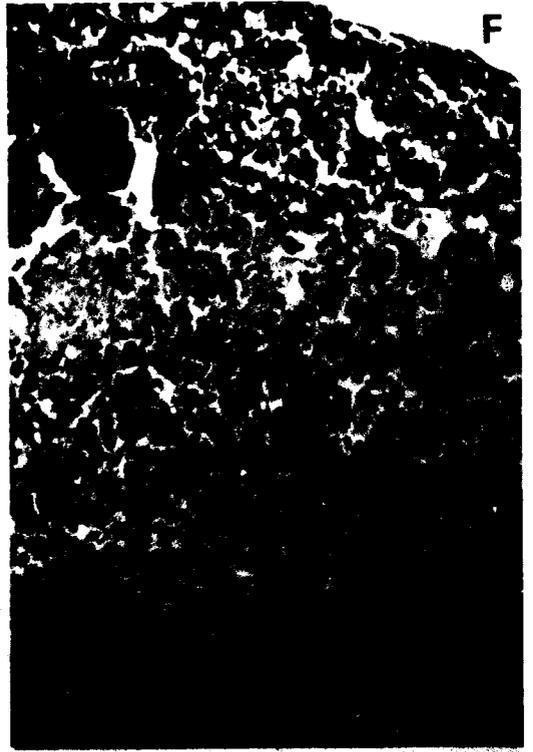




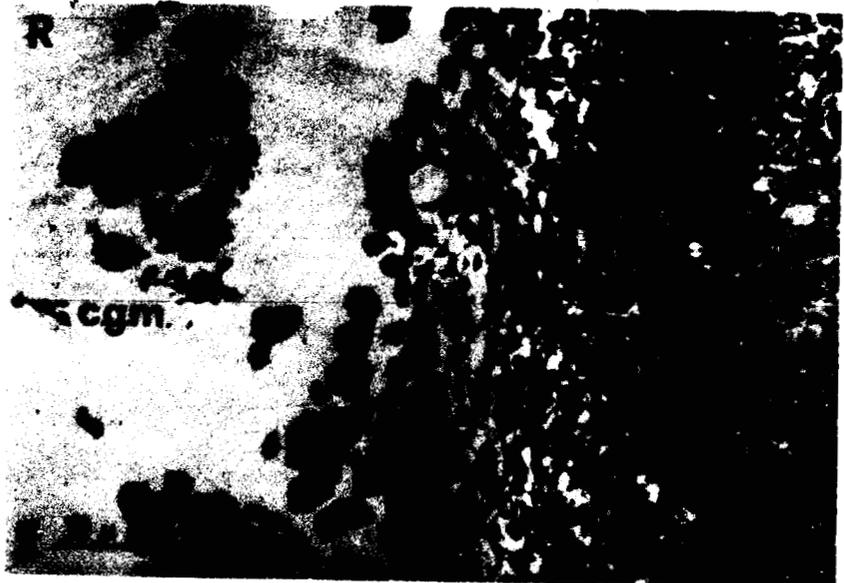
BUS  
LILLE



BUS  
LILLE

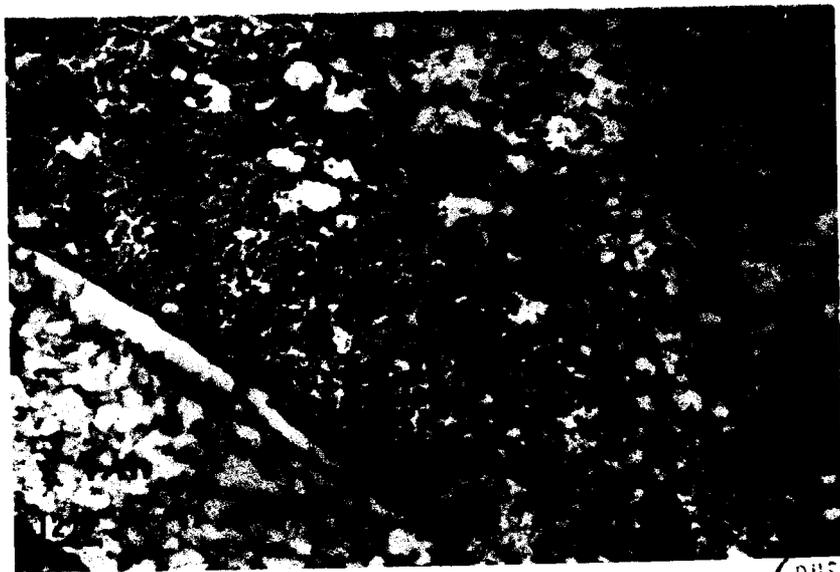
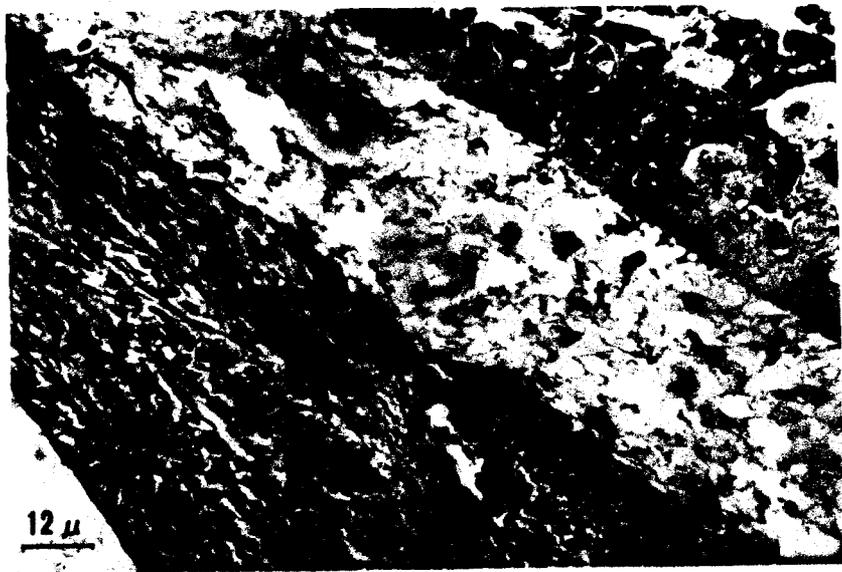
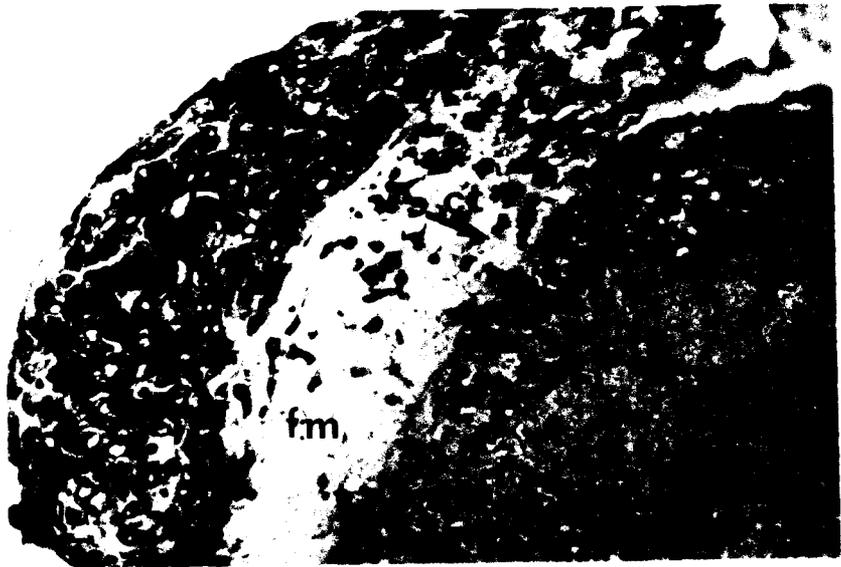


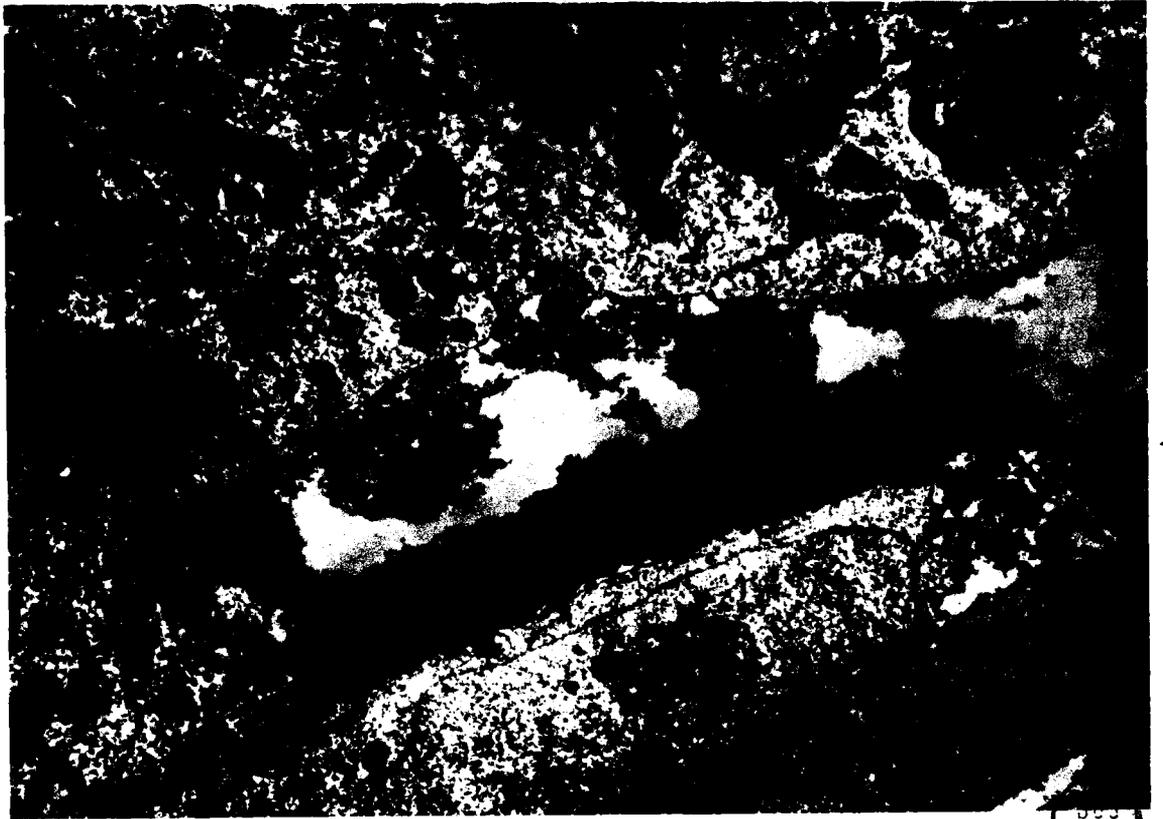
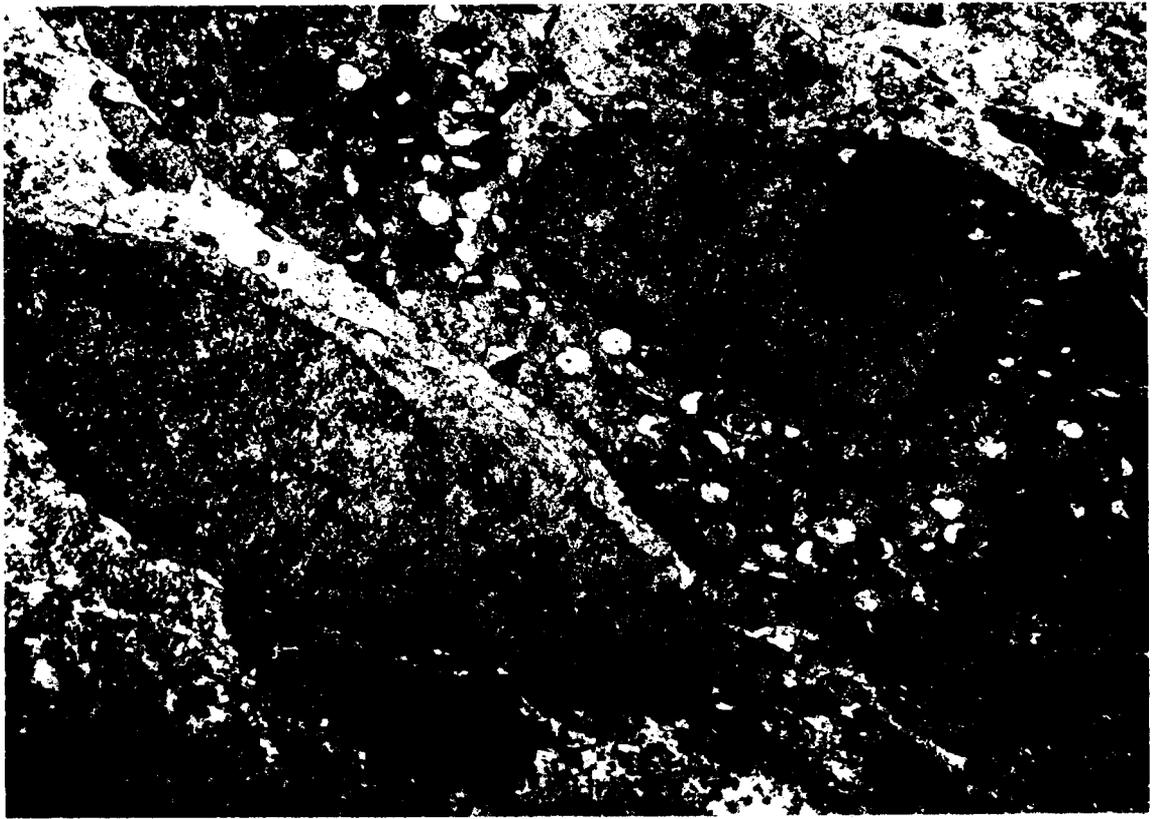
100X  
LITTLE



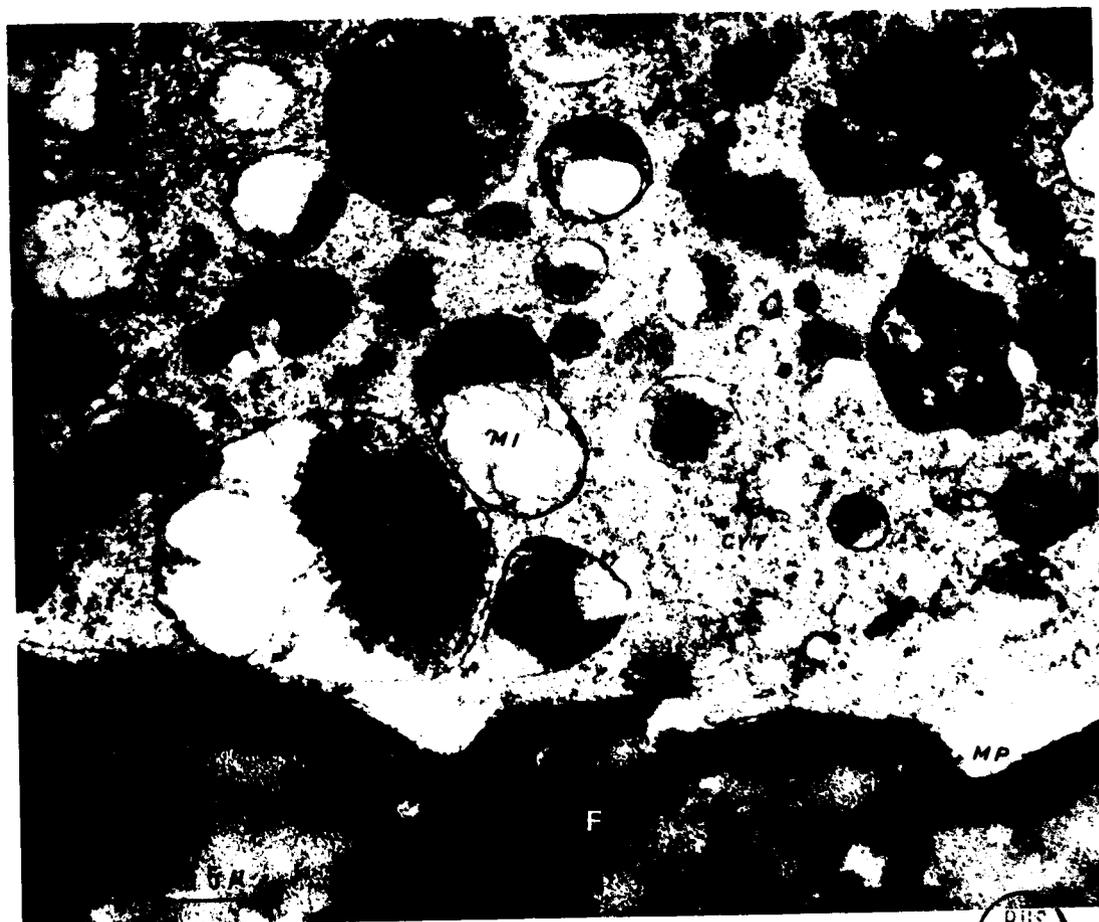
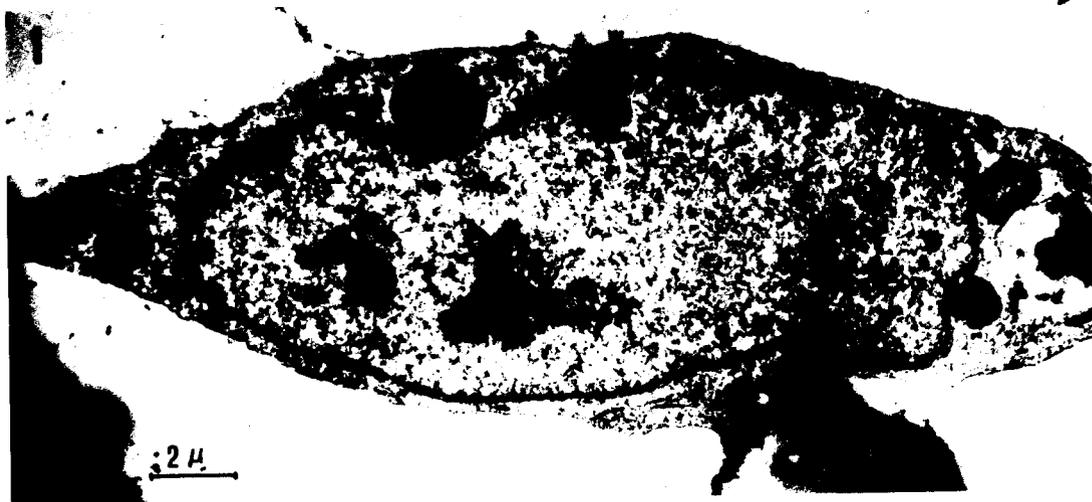


BUS  
LILLE

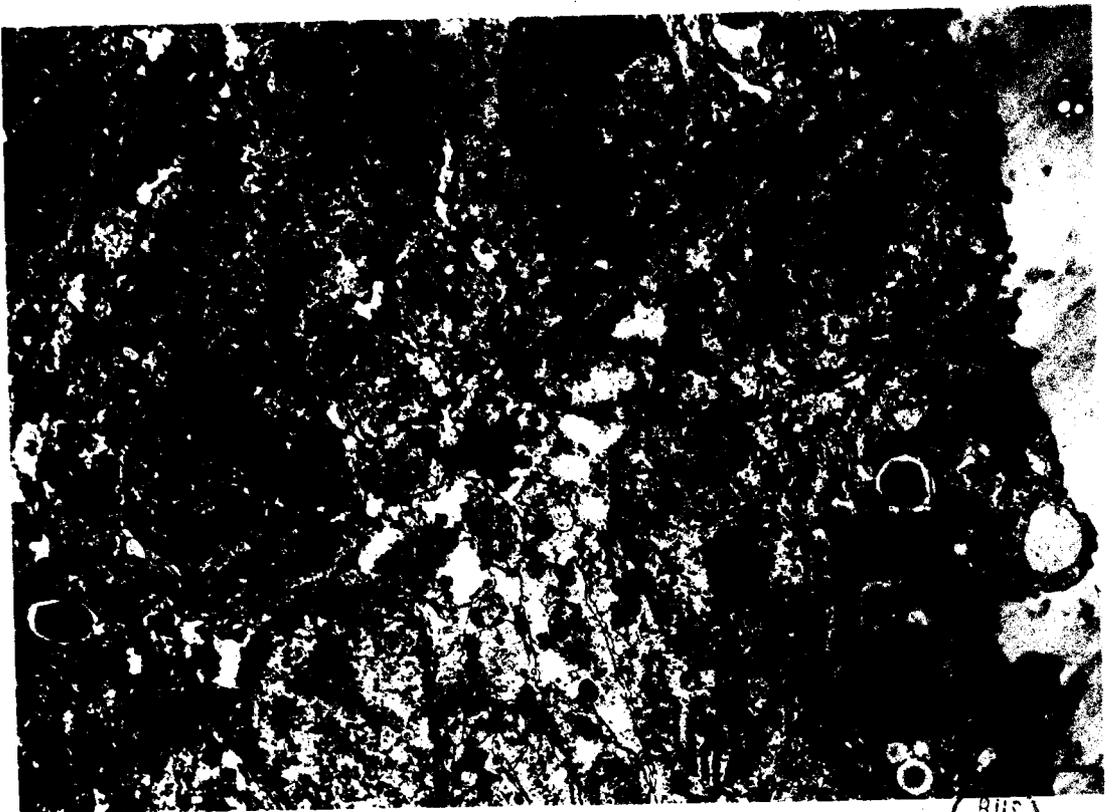
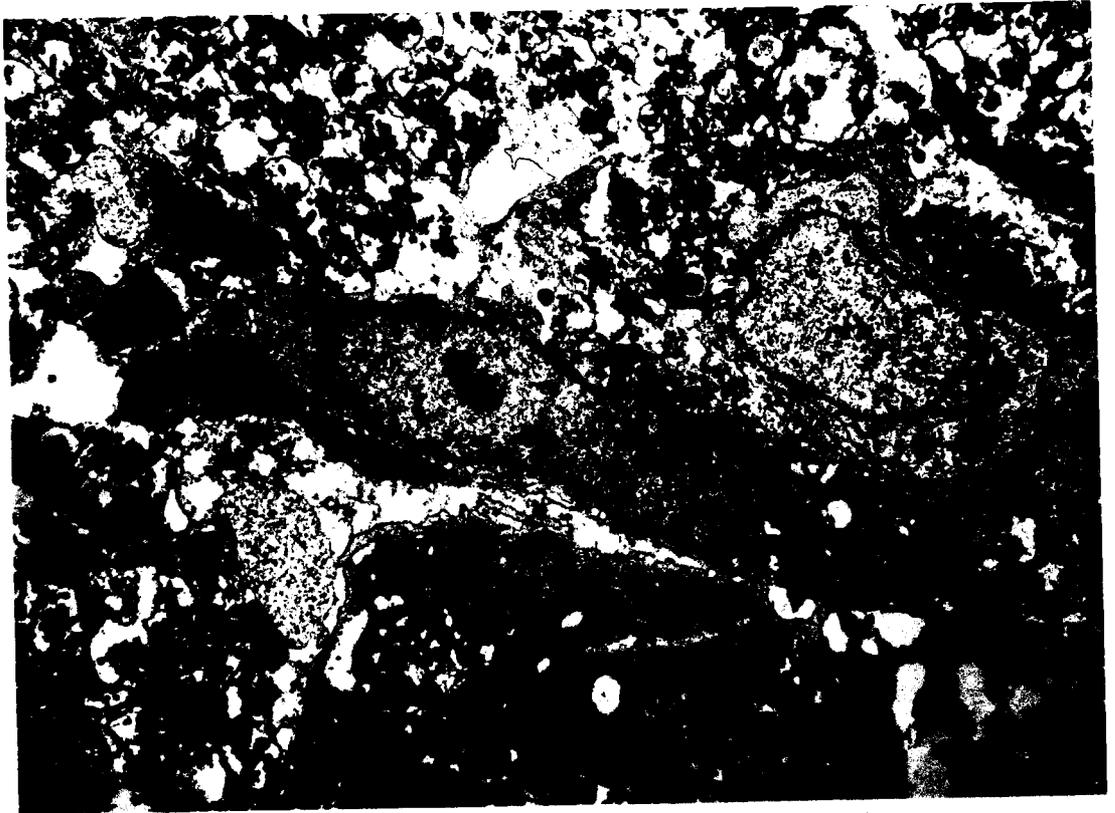




000  
LILLE



BUS  
LILLE



BUS  
L124E

